

PCT/US04/43249

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日:

2004年7月15日(15.07.2004)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2004/058770 A1

(51) 国际分类号: C07D 493/04, 493/22, A61K 31/34

(21) 国际申请号: PCT/CN2003/000095

(22) 国际申请日: 2003年1月28日(28.01.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权: 02160524.6 2002年12月27日(27.12.2002) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国科学院
上海药物研究所(SHANGHAI INSTITUTE OF
MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF
SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市太原路294号,
Shanghai 200031 (CN).

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 李援朝(LI, Yuanchao)
[CN/CN]; 左建平(ZUO, Jianping) [CN/CN]; 张凡
(ZHANG, Fan) [CN/CN]; 周如(ZHOU, Ru) [CN/CN];
丁健(DING, Jian) [CN/CN]; 中国上海市太原路294号
中国科学院上海药物研究所, Shanghai 200031
(CN).(74) 代理人: 隆天国际知识产权代理有限公司(LUNG TIN
INTERNATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY
AGENT LTD.); 中国北京市朝阳区慧忠路5号远大
中心B座18层, Beijing 100101 (CN).(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),
OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))对除美国以外的所有指定国
- 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

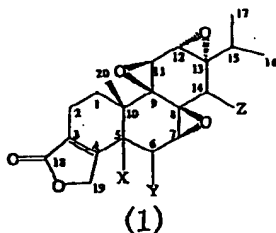
本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起处的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: TRIPTOLIDE DERIVATIVES AND THEIR USE

(54) 发明名称: 雷公藤内酯醇衍生物及其应用



(57) Abstract: Triptolide derivatives of Formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and optical isomers, Formula (I), (wherein, C5 and C6 connect with each other by a C-C single bond or double bond; when C5 and C6 are connected with C-C single bond, X and Y represents independently hydrogen, oxygen, hydroxy, halogen, lower alkyloxy, lower alkylamino, mercapto, lower alkylthio, the group of formula -OCOR, -OSO₂OR or -OPO(OH)₂, each of which is attached to C5 and C6, R represents -(CH₂)_nCO₂Na, -(CH₂)_nCO₂K or -(CH₂)_nCH₃, wherein n = 1-6; Z represents hydrogen, oxygen, hydroxy, halogen, lower alkyloxy, lower alkylamino, mercapto, lower alkylthio, the group of formula -OCOR, -OSO₂OR or -OPO(OH)₂, each of which is linked at C14-position, R represents -(CH₂)_nCO₂Na, -(CO₂)_nCO₂K, or -(CH₂)_nCH₃, wherein n = 1-6; wherein, the " " linked with X, Y, and Z represents " " or " ", provided that X and Y cannot both be hydrogen atom at the same time), the methods for preparing them and their use as antiproliferative agent, immunosuppressive agent or therapeutic agent for other related diseases.

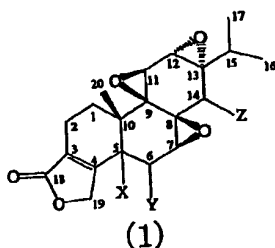
[见续页]

WO 2004/058770 A1



(57) 摘要

式(1)所示雷公藤内酯醇衍生物、其药学上可接受的盐及光学异构体:



(其中 C_5 和 C_6 以碳碳单键或碳碳双键相连; 当 C_5 和 C_6 以碳碳单键相连时, X 和 Y 分别表示连接在 C_5 位和 C_6 上的氢、氧、羟基、卤素、低级烷氧基、低级烷基、巯基、低级烷基、式-OCOR 所示基团、-OSO₂OR 所示基团或-OPO(OH)₂ 所示基团, R 表示-(CH₂)_nCO₂Na、-(CH₂)_nCO₂K 或-(CH₂)_nCH₃, n=1-6; Z 表示连接在 C_{14} 位上的氢、氧、羟基、卤素、低级烷氧基、低级烷基、巯基、低级烷基、式-OCOR 所示基团、-OSO₂OR 所示基团或-OPO(OH)₂ 所示基团, R 表示-(CH₂)_nCO₂Na、-(CH₂)_nCO₂K 或-(CH₂)_nCH₃, n=1-6; 式中, 连接 X, Y, Z 的——可代表 “” 或者 “”; 但是, X、Y 不可同时为氢原子), 其合成方法和作为抗炎剂、免疫抑制剂或相关性治疗剂的应用。

雷公藤内酯醇衍生物及其应用

技术领域

本发明涉及天然药物活性成分的结构改造及活性研究，具体涉及雷公藤二萜类内酯
5 一雷公藤内酯醇衍生物的合成及抗炎免疫抑制等药理活性的研究。

背景技术

雷公藤 *Tripterygium Wilfordii* Hook f 系卫矛科雷公藤属木质藤本植物，生于山地
林缘阴湿处，分布于长江流域以南各地及西南地区，其化学成分主要是二萜、三萜、倍半
10 萜、生物碱等。近二十年来的研究表明雷公藤具有抗炎、免疫抑制、抗生育、抗肿瘤、抗
菌等活性，特别是在免疫抑制作用方面，雷公藤中下式所示的二萜类内酯雷公藤内酯醇
(triptolide) 具有很强的药理活性。

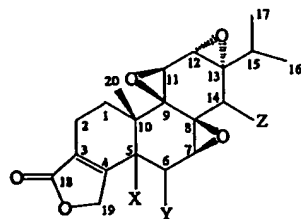
但是雷公藤内酯醇(triptolide)的毒副作用，限制了其在临床上的应用。本发明者通
过对雷公藤内酯醇构效关系的潜心研究，对其结构进行改造和修饰，获得了一批新型的雷
15 公藤内酯醇的结构类似物，从而完成了本发明。

因此，本发明的一个目的是提供高效、低毒的雷公藤内酯醇衍生物。

本发明的另一个目的是提供雷公藤内酯醇衍生物在制备抗炎剂、免疫抑制剂和治疗相
关疾病的药物上的应用。

发明概述

本发明提供的雷公藤内酯醇衍生物是通式(1)所示化合物或其药学上可接受的盐或它
们的光学异构体：



(1)



其中 C₅ 和 C₆ 以碳碳单键或碳碳双键相连；

当 C₅ 和 C₆ 以碳碳单键相连时，X 和 Y 分别表示连接在 C₅ 位和 C₆ 上的氢、氧、羟基、

卤素、低级烷氧基、低级烷基、巯基、低级烷硫基、式-OCOR 所示基团、-OSO₂OR 所示基团或-OPO(OH)₂ 所示基团,这里 R 表示-(CH₂)_nCO₂Na、-(CH₂)_nCO₂K 或-(CH₂)_nCH₃,

n=1-6;

5 Z 表示连接在 C₁₄ 位上的氢、氧、羟基、卤素、低级烷氧基、低级烷基、巯基、低级烷硫基、式-OCOR 所示基团、-OSO₂OR 所示基团或-OPO(OH)₂ 所示基团, 这里 R 表示-(CH₂)_nCO₂Na、-(CH₂)_nCO₂K 或-(CH₂)_nCH₃, n=1-6;

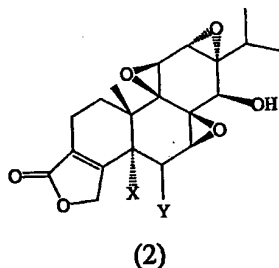
在上式中, 连接 X, Y, Z 的——可代表 “” 或者 “”;

但是, X, Y 不可同时为氢原子。

10 本发明还提供通式(1)所示雷公藤内酯醇衍生物在制备抗炎剂、免疫抑制剂或治疗相关性疾病的药物上的应用。

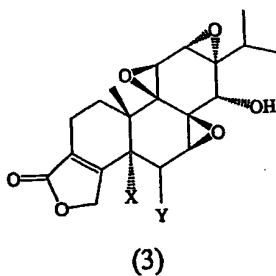
发明详述

本发明一个优选实施方案是通式(1)中 X 为 α (R)构型、Y 为 R 或 S 构型、Z = β-OH(R) 构型的雷公藤内酯醇衍生物, 即如下通式(2)所示化合物:



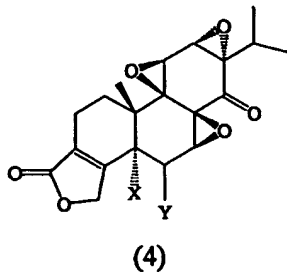
其中, X和Y定义如上。

20 本发明另一个优选实施方案是通式(1)中 X 为 α (R)构型、Y 为 R 或 S 构型、Z = α -OH(S) 构型的雷公藤内酯醇衍生物, 即如下通式(3)所示化合物:



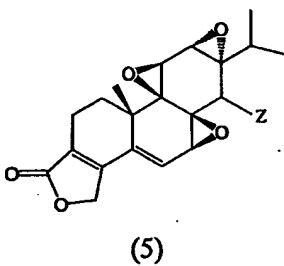
其中, X和Y定义如上。

本发明再一个优选实施方案是通式(1)中X为 α (R) 构型、Y为R或S构型、Z=O的雷公藤内酯醇衍生物，即如下通式(4)所示化合物：



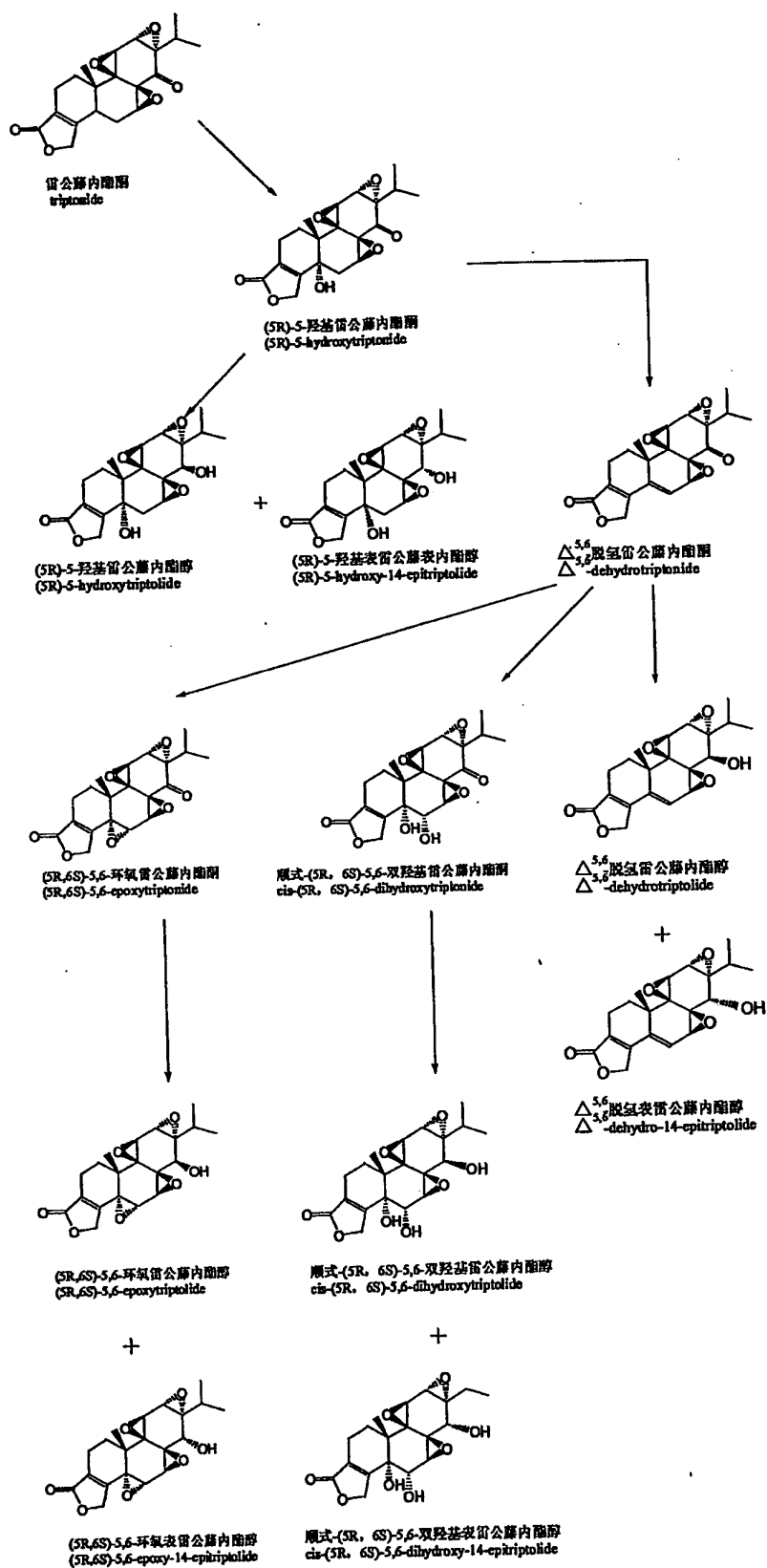
其中，X和Y定义如上。

本发明还有一个优选实施方案是通式(1)中C₅和C₆为双键、Z为R或S构型或者Z=O的雷公藤内酯醇衍生物，即如下通式(5)所示化合物：



其中，Z定义如上。

本发明的雷公藤内酯醇衍生物的合成流程示意如下：



例如,以雷公藤内酯酮为起始物,在非质子极性溶剂中,于加热条件下,由二氧化硒羟基化得到(5R)-5-羟基雷公藤内酯酮(LLDT-13);再在质子极性溶剂中还原得到(5R)-5-羟基雷公藤内酯醇(LLDT-8)和(5R)-5-羟基表雷公藤内酯醇(LLDT-14);将(5R)-5-羟基雷公藤内酯酮在非质子极性溶剂中以三氟乙酸酐脱水,得到 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯酮(LLDT-15),然后在质子极性溶剂中还原得到 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯醇(LLDT-18)和 $\Delta^{5,6}$ -脱氢表雷公藤内酯醇(LLDT-19);以 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯酮为原料,在极性溶剂中与过氧试剂发生5、6位环氧化反应,得到(5R,6S)-5,6-环氧雷公藤内酯酮(LLDT-16);再在质子极性溶剂中还原得到(5R,6S)-5,6-环氧雷公藤内酯醇(LLDT-20)和(5R,6S)-5,6-环氧表雷公藤内酯醇(LLDT-21);由 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯酮开始,在极性溶剂中通过四氧化钨或钨酸催化的5、6位双羟基化反应,生成顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基雷公藤内酯酮(LLDT-17);再在质子极性溶剂中还原得到顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基雷公藤内酯醇(LLDT-22)和顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基表雷公藤内酯醇(LLDT-23)。

本说明书中所用的术语具有如下意义:

“低级”指碳原子数为1-6个的直链或支链碳链;

“烷氧基”可为甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、异戊氧基、叔戊氧基、新戊氧基、2-甲基丁氧基、1,2-二甲基丙氧基、1-乙基丙氧基、己氧基等,以甲氧基和乙氧基为佳;

“烷胺基”可为甲胺基、乙胺基、丙胺基、异丙胺基、丁胺基、异丁胺基、仲丁胺基、叔丁胺基、戊胺基、异戊胺基、叔戊胺基、新戊胺基等一低级烷胺基,或二甲胺基、二乙胺基、二丙胺基、二异丙胺基、二丁胺基、二异丁胺基等二低级烷胺基,这些基团中较好的为甲胺基、乙胺基、二甲胺基和二乙胺基;

“烷硫基”可为甲硫基、乙硫基、丙硫基、异丙硫基、丁硫基、异丁硫基、仲丁硫基、叔丁硫基、戊硫基、异戊硫基、叔戊硫基、新戊硫基、2-甲基丁硫基、1,2-二甲基丙硫基、1-乙基丙硫基、己硫基等,以甲硫基和乙硫基为佳;

“极性溶剂”为例如乙酸乙酯,二氧六环,丙酮,叔丁醇等;

“非质子极性溶剂”指例如二甲亚砜、N,N-二甲基甲酰胺、二氯甲烷、三氯甲烷、四氢呋喃、二氧六环、乙二醇二甲醚等;

“质子极性溶剂”指例如甲醇,乙醇、丙醇、叔丁醇等;

“加热条件”指室温以上至溶剂回流温度;

“过氧试剂”为例如间氯过氧苯甲酸、过氧叔丁醇、双氧水等；

“药学上可接受的盐”具体地可列举与丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、等有机酸和天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸形成酯后再与无机碱形成的盐，如钠、钾、钙、铝盐和铵盐，或与有机碱形成的盐，如甲胺盐、乙胺盐、乙醇胺盐等，或与赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸等碱性氨基酸形成酯后的盐酸、氢溴酸、氢氟酸、硫酸、硝酸、磷酸等无机酸的盐，或与甲酸、乙酸，苦味酸、甲磺酸、乙磺酸等有机酸的盐；

“光学异构体”的含义包括对映异构体、非对映异构体、光学异构体的混合物及纯光学异构体。

本发明的雷公藤内酯醇衍生物、其药学上可接受的盐或光学异构体可制成含活性成分0.001- 99.9%（重量）以及适量药学上可接受的载体的各种制剂，如适合于口服、注射或肠道给药使用的制剂形式。

可根据受治疗者的年龄（月龄或周龄）、一般健康状况、疾病严重程度和病程、给药途径、个体对药物的敏感性等对受治疗者施用含治疗有效量本发明化合物的药物制剂。

附图说明

图 1 显示雷公藤内酯醇（LLDT-2）对淋巴细胞的细胞毒性。

图 2 显示(5R)-5-羟基雷公藤内酯醇（LLDT-8）对淋巴细胞的细胞毒性。

图 3 显示 LLDT-8 抑制 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖反应。

图 4 显示 LLDT-2 抑制 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖反应。

图 5 显示 CsA 抑制 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖反应。

图 6 显示 LLDT-8 抑制 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖反应。

图 7 显示 LLDT-2 抑制 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖反应。

图 8 显示 CsA 抑制 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖反应。

图 9 显示 LLDT-8 抑制 B6 抗 Balb/c 混合淋巴细胞增殖反应。

图 10 显示 CsA 抑制 B6 抗 Balb/c 混合淋巴细胞增殖反应。

图 11 显示 LLDT-8 对大鼠佐剂性关节炎继发性病变的防治作用。

图 12 是显示 LLDT-8 防治佐剂性关节炎效果的照片。图中，A) 为正常大鼠对照组；B) 为关节炎模型组；C) -E) 分别为 LLDT-8 如下剂量组：3mg/kg、1mg/kg、0.2mg/kg；F) 为

CsA 10mg/kg。

图 13 显示 LLDT-8 对大鼠佐剂性关节炎多发性病变的防治作用(四肢临床症状观测)。

图 14 显示 LLDT-8 改善大鼠佐剂性关节炎体重减轻作用。

图 15 显示 LLDT-8 抑制佐剂性关节炎大鼠 B 淋巴细胞对 LPS 诱导的增殖反应的效果。

图 16 显示 LLDT-8 对大鼠佐剂性关节炎继发性病变的治疗作用。

5 图 17 显示 LLDT-8 对大鼠佐剂性关节炎多发性病变的治疗作用(四肢临床症状观测)。

图 18 显示 LLDT-8 对牛 II 型胶原诱导的 DBA/1 小鼠关节炎的治疗作用。

图 19 是显示 LLDT-8 对牛 II 型胶原诱导的 DBA/1 小鼠关节炎治疗效果的照片。

图 20 显示不同剂量 LLDT-8 对牛 II 型胶原诱导的 DBA/1 小鼠关节炎的治疗作用。

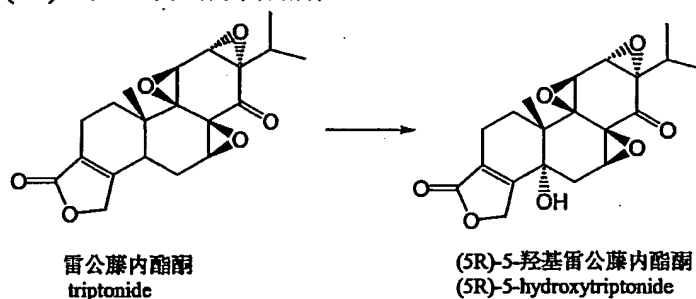
图 21 显示 LLDT-8 抑制 DBA/1 关节炎小鼠抗牛 II 型胶原特异性抗体的产生。

10

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步阐述, 但这些实施例绝不是对本发明的任何限制。

实施例 1 (5R)-5-羟基雷公藤内酯酮



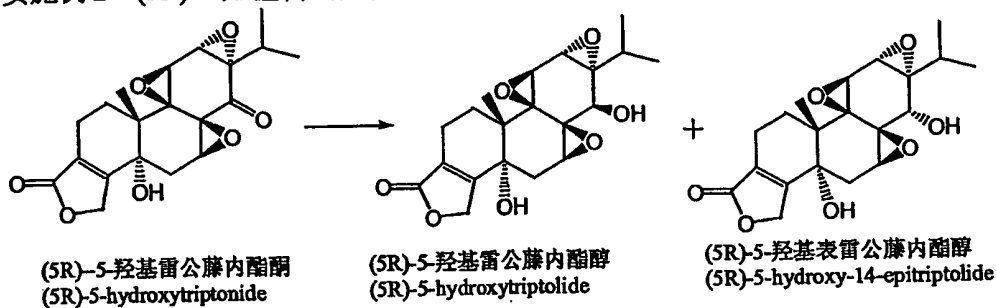
15 将雷公藤内酯酮 (374 mg, 1.04 mmol)溶解在 20ml 二甲亚砜中, 然后加入 SeO_2 (461 mg, 4.16 mmol), 加热微回流 10 小时。反应体系冷却至室温, 过滤, 乙酸乙酯洗涤滤渣, 洗涤液与滤液合并, 减压蒸去溶剂。残渣用饱和 Na_2CO_3 溶解, 乙酸乙酯萃取, 有机相用水和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸去溶剂, 得白色固体(5R)-5-羟基雷公藤内酯酮 (319 mg, 0.85 mmol, 产率 82%)。

20 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400MHz) δ 4.88 (m, 2H), 4.11 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 4.08 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 3.42 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 2.24 (七重峰, $J = 6.9$ Hz, 1H), 1.96–2.20 (m, 4H), 1.83 (ddd, $J = 6.4, 11.7, 11.8$ Hz, 1H), 1.08 (宽, dd, $J = 5.2, 12.4$ Hz, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.88 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.78 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 100 MHz) δ 198.4, 173.2, 161.9, 124.5, 69.9, 68.7, 65.1, 64.2, 61.0, 59.0, 58.7, 56.0, 29.7, 25.5, 24.2, 18.0, 16.8, 16.3, 16.0; IR (KBr)

25 3508, 2962, 1765, 1709, 1040 cm^{-1} ; LRMS (EI, 70 eV) m/z 374 (M^+ , 9), 331 (35), 217 (43), 191

(50), 113 (100); mp 244-246 °C (分解)。

实施例2 (5R)-5-羟基雷公藤内酯醇和(5R)-5-羟基表雷公藤内酯醇



5 在 0 °C, 向用 5 mL 甲醇溶解的(5R)-5-羟基雷公藤内酯酮 (20 mg, 0.053 mmol)的悬浊液中加入 NaBH₄ (8 mg, 0.21 mmol), 搅拌反应 2 小时, 反应体系变为无色澄清溶液, 减压蒸去溶剂, 残渣用乙酸乙酯溶解, 用水和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干溶剂, 残渣用柱层析分离(洗脱剂: 环己烷: 乙酸乙酯=1: 1), 得 (5R)-5-羟基雷公藤内酯醇 (7.5 mg, 0.02 mmol, 产率 38%) 和(5R)-5-羟基表雷公藤内酯醇(11.3 mg, 0.03 mmol, 产率 56%)。

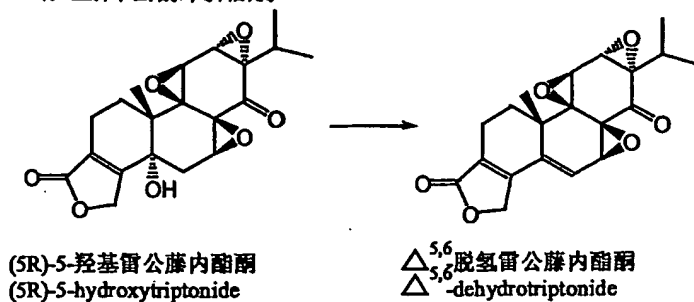
(5R)-5-羟基雷公藤内酯醇:

¹H-NMR(DMSO-d₆, 400Hz) δ5.32(s, 1H), 4.87(m, 2H), 4.57(br.s, 1H), 3.73(d, J=2.9Hz, 1H), 3.53(d, J=2.9Hz, 1H), 3.38(s, 1H), 3.34(d, J=5.0Hz, 1H), 2.07-2.19(m, 4H), 1.94-2.06(m, 1H), 1.76(ddd, J=6.4, 11.6, 11.9Hz, 1H), 1.05(dd, J=5.3, 12.4Hz, 1H), 0.99(s, 3H), 0.90(d, J=6.9Hz, 3H), 0.77(d, J=6.9 Hz, 3H); ¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100Hz) 173.2, 162.7, 124.1, 71.0, 69.7, 68.6, 63.9, 62.6, 61.4, 58.7, 55.9, 54.0, 30.3, 27.3, 23.1, 17.6, 16.8, 16.6, 16.3; IR(KBr) 3467, 2962, 1765, 1433, 1030 cm⁻¹; MS(EI, 70eV) m/z 377(M+1, 3), 343(4), 329(22), 287(27), 163(30), 71(47), 43(100); mp 240-242 °C (分解)。

(5R)-5-羟基表雷公藤内酯醇:

¹H-NMR(DMSO-d₆, 400Hz) δ5.32(br.s, 1H), 4.89(m, 2H), 4.14(br.s, 1H), 3.72(d, J=2.9Hz, 1H), 3.58(d, J=5.1Hz, 1H), 3.45(d, J=2.9Hz, 1H), 2.23(七重峰, J=6.9Hz, 1H), 1.99-2.19(m, 4H), 1.79 (ddd, J=6.6, 11.7, 12.1Hz, 1H), 1.07(m, 1H), 0.99(s, 3H), 0.97(d, J=6.9Hz, 3H), 0.70(d, J=6.9Hz, 3H); ¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100Hz) δ173.2, 162.8, 124.0, 69.6, 68.6, 65.5, 65.3, 63.8, 62.0, 56.5, 53.4, 52.1, 30.1, 26.7, 23.6, 19.0, 16.8, 16.2, 15.6; IR(KBr) 3458, 3392, 2955, 1751, 1030 cm⁻¹; MS(EI, 70eV) m/z 376(M⁺, 8), 359(41), 273(46), 193(55), 71(100); mp 238-240 °C (分解)。

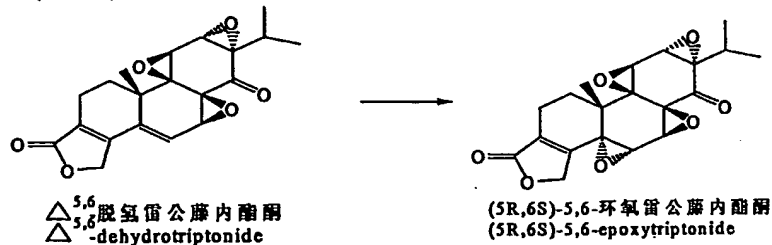
实施例3 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯酮



将(5R)-5-羟基雷公藤内酯酮 (224mg, 0.60mmol) 加入无水吡啶(4ml, 50.57mmol)的二氯甲烷 (10ml) 溶液中, 搅拌溶解, 然后在 5 分钟内滴加三氟乙酸酐(600mg, 2.85mmol), 室温下反应 12 小时, 薄层层析(环己烷: 乙酸乙酯=1: 1)检查原料消失后, 终止反应, 减压蒸去溶剂, 残渣用水 (20ml) 稀释, 加乙酸乙酯 (40ml×3) 萃取, 有机相分别用稀硫酸、饱和碳酸氢钠溶液和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 蒸去溶剂, 得棕黄色油状物, 柱层析分离 (洗脱剂: 环己烷: 乙酸乙酯=3: 1), 环己烷—乙酸乙酯重结晶, 得白色晶体 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯酮 (166mg, 0.47mmol, 产率 75%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}) \delta 6.01(\text{d}, J=3.7\text{Hz}, 1\text{H}), 4.90(\text{m}, 2\text{H}), 4.01(\text{d}, J=2.9\text{Hz}, 1\text{H}), 3.84(\text{d}, J=2.9\text{Hz}, 1\text{H}), 3.47(\text{d}, J=3.7\text{Hz}, 1\text{H}), 2.46-2.51(\text{m}, 1\text{H}), 2.44(\text{七重峰}, J=6.9\text{Hz}, 1\text{H}), 2.24-2.36(\text{m}, 1\text{H}), 1.50(\text{d}, J=3.7\text{Hz}, 1\text{H}), 1.47-1.49(\text{m}, 1\text{H}), 1.31(\text{s}, 3\text{H}), 0.99(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H}), 0.89(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H});$
 $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 100\text{MHz}) \delta 196.3, 172.7, 152.5, 141.0, 127.7, 120.0, 68.8, 66.3, 65.3, 64.5, 59.6, 56.5, 55.6, 37.1, 30.3, 25.6, 22.9, 18.0, 17.1, 16.3; \text{IR}(\text{KBr}) 3432, 2960, 2850, 1762, 1724, 1433, 1356, 1038$
 $\text{cm}^{-1}; \text{MS}(\text{EI}, 70\text{eV}) m/z 356(\text{M}^+, 21), 338(31), 323(43), 285(87), 257(89), 128(96), 115(100); \text{mp } 242-244^\circ\text{C}(\text{分解})。$

实施例4 (5R,6S)-5,6-环氧雷公藤内酯酮



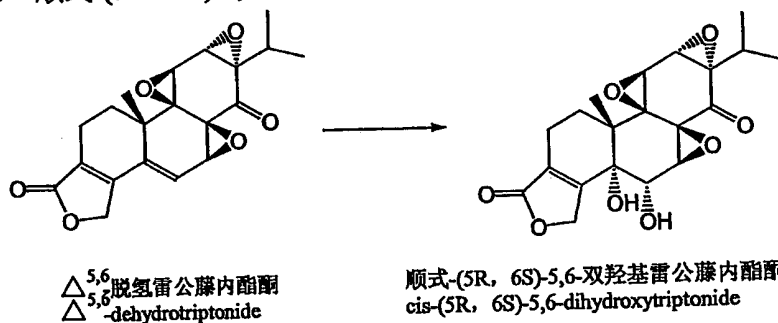
将 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯酮(280mg, 0.78mmol)溶解在 10ml 无水二氯甲烷中, 加入 70-75%间氯过氧苯甲酸(500mg, 2.03mmol), 加热回流反应 6 小时, 加入 5%硫代硫酸钠溶液终止反应, 加入二氯甲烷 30ml 稀释反应体系, 分出有机相, 水相用二氯甲烷 20ml 分别提取两次, 合并有机相, 分别用饱和碳酸氢钠溶液和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥,

减压蒸去溶剂,残渣柱层析分离(洗脱剂:环己烷:乙酸乙酯=4:1),得白色固体(5R,6S)-5,6-环氧雷公藤内酯酮 (220mg, 0.59mmol,产率 75%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz})\delta 4.63(\text{m}, 2\text{H}), 3.91(\text{d}, J=2.9\text{Hz}, 1\text{H}), 3.84(\text{d}, J=2.9\text{Hz}, 1\text{H}), 3.81(\text{d}, J=2.2\text{Hz}, 1\text{H}), 3.62(\text{d}, J=2.2\text{Hz}, 1\text{H}), 2.47-2.52(\text{m}, 1\text{H}), 2.38(\text{七重峰}, J=6.9\text{Hz}, 1\text{H}), 2.26-2.33(\text{m}, 1\text{H}), 1.69(\text{dt}, J=6.2, 12.0\text{Hz}, 1\text{H}), 1.50-1.57(\text{m}, 1\text{H}), 1.28(\text{s}, 3\text{H}), 0.96(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H}), 0.86(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H});$
 $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 100\text{MHz})\delta 195.5, 171.8, 153.9, 134.0, 67.8, 66.7, 63.1, 62.3, 60.3, 59.6, 58.1, 56.7,$
 $55.8, 36.3, 27.3, 25.6, 17.9, 17.6, 17.5, 16.3; \text{IR}(\text{KBr}) 3446, 2966, 1766, 1732, 1431, 1229, 1038\text{cm}^{-1};$
 $\text{MS}(\text{EI}, 70\text{eV}) m/z 372(\text{M}^+, 6), 357(13), 329(4), 231(100), 203(12), 187(9); \text{mp } 252-254^\circ\text{C}(\text{分解}).$

10

实施例 5 顺式-(5R, 6S)-5,6-双羟基雷公藤内酯酮

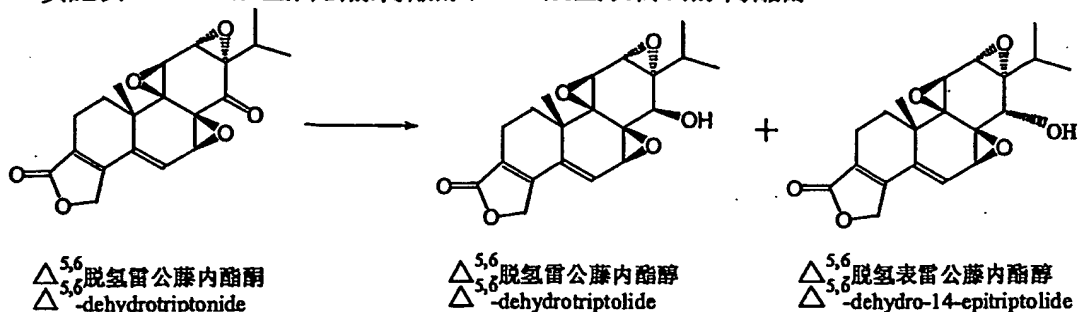


将 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯酮 (72mg, 0.20mmol) 溶解于 3.2ml 二氧六环中, 然后在搅拌下在该体系中加入 1.6ml 水、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (250mg, 0.76mmol)、 K_2CO_3 (100mg, 0.72mmol) 以及 OsO_4 (2.6mg, 0.01mmol), 在室温下搅拌 14 小时, 加入 2ml 饱和亚硫酸钠溶液终止反应, 体系用稀硫酸调节至中性, 乙酸乙酯萃取 (10ml \times 3), 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸去溶剂, 残渣柱层析纯化(洗脱剂: 环己烷: 乙酸乙酯=3: 2), 得白色固体顺式-(5R, 6S)-5,6-双羟基雷公藤内酯酮 (29mg, 0.07mmol, 产率 37%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6, 400\text{MHz})\delta 4.91(\text{m}, 2\text{H}), 4.12(\text{d}, J=2.9\text{Hz}, 1\text{H}), 4.11(\text{d}, J=2.9\text{Hz}, 1\text{H}), 4.01(\text{s}, 1\text{H}), 3.15(\text{s}, 1\text{H}), 2.23(\text{七重峰}, J=6.9\text{Hz}, 1\text{H}), 2.09-2.17(\text{m}, 1\text{H}), 1.95-2.07(\text{m}, 1\text{H}), 1.85(\text{dt}, J=5.4, 11.9\text{Hz}, 1\text{H}), 1.07(\text{dd}, J=4.6, 12.1\text{Hz}, 1\text{H}), 0.88(\text{s}, 3\text{H}), 0.87(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H}), 0.78(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H});$
 $^{13}\text{C-NMR}(\text{DMSO}-d_6, 100\text{MHz})\delta 197.7, 173.1, 160.4, 125.6, 72.6, 71.0, 65.7, 65.0, 64.6, 64.0, 61.4,$
 $58.6, 56.0, 25.6, 24.8, 18.0, 16.8, 16.0, 15.7; \text{IR}(\text{KBr}) 3431, 2968, 1740, 1724, 1672, 1429, 1136, 1022\text{cm}^{-1};$
 $\text{MS}(\text{EI}, 70\text{eV}) m/z 390(\text{M}^+, 8), 372(37), 361(40), 343(35), 179(72), 167(100), 113(83); \text{mp } 266-268^\circ\text{C}(\text{分解}).$

25

实施例6 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯醇和 $\Delta^{5,6}$ -脱氢表雷公藤内酯醇



将 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯酮 (36mg, 0.1mmol) 在 3ml 甲醇中的悬浊液冷却至 0℃, 加入 NaBH_4 (8 mg, 0.2mmol), 反应 1 小时, 薄层层析(环己烷: 乙酸乙酯=1: 1)检查原料完全消失, 稀硫酸调节 pH 值至中性, 减压蒸干溶剂, 残渣用水 10ml 溶解, 乙酸乙酯萃取 (20ml×3), 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸去溶剂, 油状物用柱层析分离(洗脱剂: 环己烷: 乙酸乙酯=3: 1), 得白色固体 $\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯醇 (18mg, 0.05mmol, 产率 50%) 和 $\Delta^{5,6}$ -脱氢表雷公藤内酯醇 (18mg, 0.05mmol, 产率 50%)。

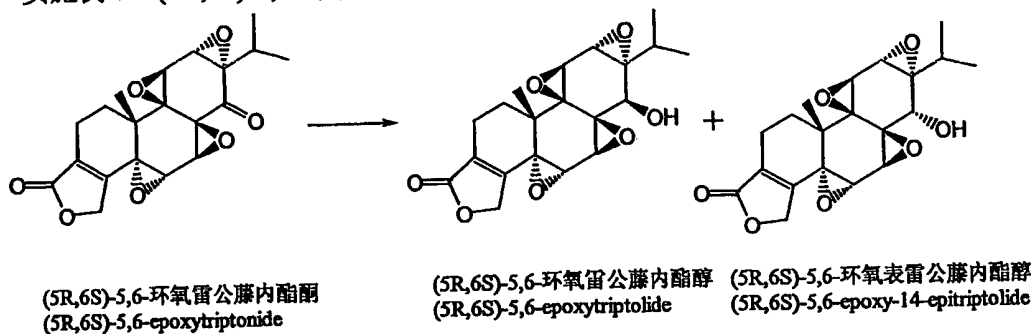
$\Delta^{5,6}$ -脱氢雷公藤内酯醇:

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}) \delta 6.02(\text{d}, J=3.9\text{Hz}, 1\text{H}), 4.88(\text{m}, 2\text{H}), 3.88(\text{d}, J=3.3\text{Hz}, 1\text{H}), 3.58(\text{d}, J=11.0\text{Hz}, 1\text{H}), 3.52(\text{d}, J=3.3\text{Hz}, 1\text{H}), 3.45(\text{d}, J=3.9\text{Hz}, 1\text{H}), 2.87(\text{d}, J=11.0\text{Hz}, 1\text{H}), 2.43-2.48(\text{m}, 1\text{H}), 2.29-2.33(\text{m}, 1\text{H}), 2.25(\text{七重峰}, J=6.9\text{Hz}, 1\text{H}), 1.36-1.49(\text{m}, 2\text{H}), 1.34(\text{s}, 3\text{H}), 1.03(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H}), 0.90(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H}); ^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 100\text{MHz}) \delta 172.9, 152.8, 140.0, 127.1, 121.5, 73.8, 68.8, 66.1, 65.1, 63.3, 57.6, 55.9, 55.0, 37.2, 29.7, 28.1, 22.5, 17.8, 17.0, 16.9; \text{IR}(\text{KBr}) 3626, 3473, 2968, 1776, 1749, 1655, 1416, 1040, 1024\text{cm}^{-1}; \text{MS}(\text{EI}, 70\text{eV}) m/z 358(\text{M}^+, 2), 343(3), 325(10), 299(29), 269(17), 245(100), 128(26); mp 194-196°C.$

$\Delta^{5,6}$ -脱氢表雷公藤内酯醇:

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}) \delta 6.07(\text{d}, J=4.2\text{Hz}, 1\text{H}), 4.90(\text{m}, 2\text{H}), 4.63(\text{d}, J=3.0\text{Hz}, 1\text{H}), 3.76(\text{d}, J=4.8\text{Hz}, 1\text{H}), 3.73(\text{d}, J=3.1\text{Hz}, 1\text{H}), 3.40(\text{d}, J=3.1\text{Hz}, 1\text{H}), 2.42-2.47(\text{m}, 1\text{H}), 2.37(\text{七重峰}, J=6.9\text{Hz}, 1\text{H}), 2.22-2.34(\text{m}, 1\text{H}), 1.93(\text{d}, J=3.0\text{Hz}, 1\text{H}), 1.34-1.49(\text{m}, 2\text{H}), 1.31(\text{s}, 3\text{H}), 1.11(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H}), 0.83(\text{d}, J=6.9\text{Hz}, 3\text{H}); ^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 100\text{MHz}) \delta 173.0, 153.1, 140.6, 127.0, 122.0, 68.9, 66.2, 65.7, 64.8, 64.4, 56.7, 53.2, 51.6, 37.4, 29.9, 27.4, 22.6, 19.0, 17.1, 15.8; \text{IR}(\text{KBr}) 3435, 2966, 1778, 1753, 1429, 1086\text{cm}^{-1}; \text{MS}(\text{EI}, 70\text{eV}) m/z 358(\text{M}^+, 13), 343(14), 329(23), 315(35), 257(70), 192(77), 97(100); mp 172-174°C.$

实施例7 (5R,6S)-5,6-环氧雷公藤内酯醇和(5R,6S)-5,6-环氧表雷公藤内酯醇



将(5R,6S)-5,6-环氧雷公藤内酯酮 (36mg,0.1mmol)在3ml 甲醇中的悬浊液冷却至0℃,加入 NaBH₄(8mg,0.2mmol),反应1小时,薄层层析(环己烷:乙酸乙酯=1:1)检查原料完全消失后用稀硫酸调节 pH 值至中性,减压蒸干溶剂,残渣用水 10ml 溶解,乙酸乙酯萃取 (20ml×3),饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去溶剂,油状物用柱层析分离(洗脱剂:环己烷:乙酸乙酯=3:1),得白色固体(5R,6S)-5,6-环氧雷公藤内酯醇 (20mg,0.053mmol,产率 56%) and (5R,6S)-5,6-环氧表雷公藤内酯醇 (16mg,0.043mmol,产率 43%)。

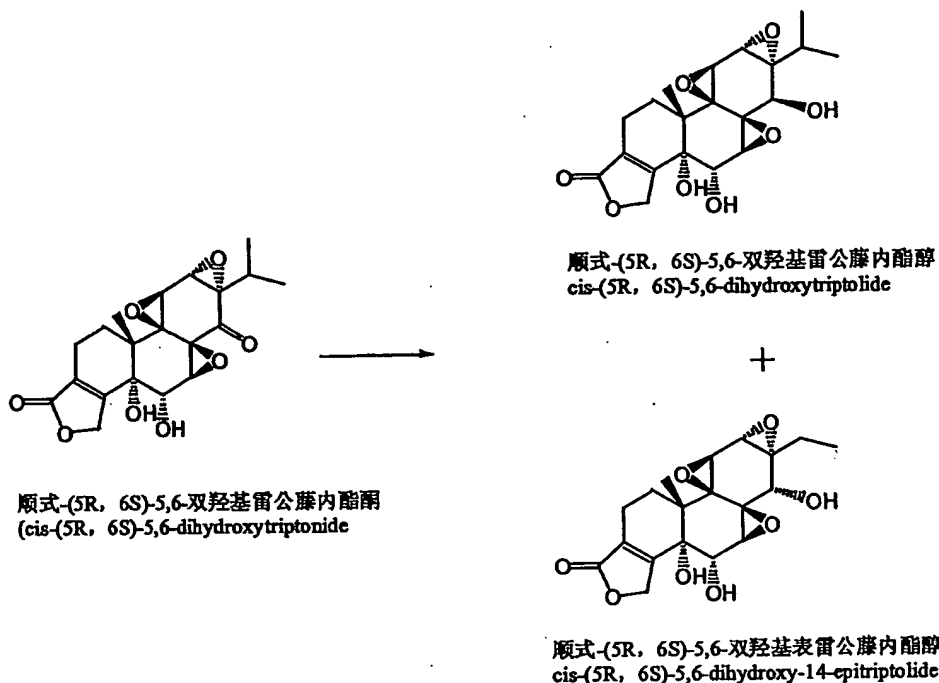
(5R,6S)-5,6-环氧雷公藤内酯醇:

¹H-NMR(CDCl₃,600MHz)δ4.62(m,2H),3.80(d,J=1.5Hz,1H),3.79(d,J=2.9Hz,1H),3.59(d,J=2.5Hz,1H),3.51(d,J=2.9Hz,1H),3.41(d,J=12.2Hz,1H),2.78(d,J=12.2Hz,1H),2.45-2.49(m,1H),2.28-2.33(m,1H),2.20(七重峰,J=6.9Hz,1H),1.58-1.63(m,1H),1.47-1.51(m,1H),1.31(s,3H),0.99(d,J=6.9Hz,3H),0.87(d,J=6.9Hz,3H);¹³C-NMR(CDCl₃,100MHz)δ172.0,154.3,133.9,74.0,67.9,65.1,64.2,61.1,59.8,58.2,57.6,57.1,55.0,36.4,28.0,26.7,17.7,17.4,16.9;IR(KBr)3489,2928,1778,1431,1039cm⁻¹;MS(EL70eV)m/z374(M⁺,1),358(3),329(9),257(38),231(44),71(100); mp 248-250 °C (分解)。

(5R,6S)-5,6-环氧表雷公藤内酯醇:

¹H-NMR(CDCl₃,400MHz)δ4.66(m,2H),4.52(d,J=2.9Hz,1H),3.93(d,J=2.6Hz,1H),3.84(d,J=2.6Hz,1H),3.67(d,J=3.1Hz,1H),3.41(d,J=3.1Hz,1H),2.45-2.52(m,1H),2.35(七重峰,J=6.9Hz,1H),2.24-2.32(m,1H),1.80(d,J=2.9Hz,1H),1.61-1.67(m,1H),1.49-1.53(m,1H),1.28(s,3H),1.08(d,J=6.9Hz,3H),0.81(d,J=6.9Hz,3H);¹³C-NMR(CDCl₃,100MHz)δ172.1,154.7,133.8,67.9,65.6,65.5,62.8,62.2,60.1,57.8,56.2,53.8,52.9,36.6,27.2,26.9,18.9,17.5,17.4,15.7;IR(KBr)3485,2928,1751,1435,1082,1040cm⁻¹;MS(EL70eV)m/z374(M⁺,1),358(4),345(10),327(11),257(40),231(98),71(100); mp 200-202°C (分解)。

实施例 8 顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基雷公藤内酯醇和顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基表雷公藤内酯醇



将顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基雷公藤内酯酮 (39mg,0.1mmol)在3ml 甲醇中的悬浊液冷却至 0℃, 加入 NaBH₄(8mg,0.2mmol),反应 1 小时, 薄层层析(环己烷: 乙酸乙酯=1: 1)检查原料完全消失后用稀硫酸调节 pH 值至中性,减压蒸干溶剂,残渣用水 10ml 溶解,乙酸乙酯萃取 (20ml×3),饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,减压蒸去溶剂,油状物用柱层析分离(洗脱剂: 环己烷: 乙酸乙酯=1: 1),得白色固体顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基雷公藤内酯醇 (10mg, 0.026mmol,25%)和顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基表雷公藤内酯醇 (30mg,0.074mmol,75%)。

10 顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基雷公藤内酯醇:

¹H-NMR(DMSO-d₆,400MHz)δ4.90(m,2H),3.96(s,1H),3.75(d,J=2.9Hz,1H),3.52(d,J=2.9 Hz,1H),3.39(s,1H),3.14(s,1H),2.16(七重峰,J=6.9Hz,1H),2.06-2.13(m,1H), 1.92-2.06(m,1H), 1.71-1.82(m,1H),1.01-1.08(m,1H),0.95(s,3H),0.89(d,J=6.9Hz,3H),0.75(d,J=6.9Hz,3H);

¹³C-NMR(DMSO-d₆,100MHz)δ173.2,161.2,125.3,72.4,70.8,70.5,66.3,64.9,63.9,62.2,62.1,55.8, 15 53.9,27.3,23.7,17.6,16.9,16.6,15.7;IR(KBr)3572,3494,3380,2926,1766,1427,1350,1041,1016 cm⁻¹;MS(EI,70eV)m/z392(M⁺,1),377(6),374(4),359(10),349(50),303(52),167(100),71(98); mp 232-234 °C (分解)。

顺式-(5R,6S)-5,6-双羟基表雷公藤内酯醇:

¹H-NMR(DMSO-d₆,400MHz)δ4.89(m,2H),4.09(s,1H),3.96(s,1H),3.73(d,J=2.9Hz,1H),

3.42(d, J=2.9Hz, 1H), 3.41(s, 1H), 2.19(七重峰, J=6.9Hz, 1H), 2.06-2.11(m, 1H), 1.93-2.03(m, 1H),
 1.76-1.81(m, 1H), 0.99-1.03(m, 1H), 0.95(d, J=6.9Hz, 3H), 0.94(s, 3H), 0.68(d, J=6.9Hz, 3H);
¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 173.2, 161.4, 125.2, 72.4, 70.8, 66.3, 65.4, 63.5, 62.8, 59.7, 56.6, 52.3,
 26.9, 24.2, 19.1, 17.0, 15.6; IR(KBr) 3504, 2962, 1714, 1444, 1242, 1053 cm⁻¹; MS(EI, 70eV) m/z 392
 5 (M⁺, 1) 374(2), 349(13), 303(14), 257(11), 179(44), 91(95), 71(100); mp 246-248 °C (分解)。

试验例

以下试验例中, 受试药物由上海药物研究所合成室提供, 纯度>99%。以母体化合物雷公藤内酯醇(LLDT-2)作为对照。

- 10 试验动物: Balb/c 纯系小鼠、ICR 小鼠和昆明种小鼠, 6-8 周龄, 购于中科院上海实验动物中心, 动物合格证书号: 中科沪动管第 99-003 号。C57BL/6 纯系小鼠, 6-8 周龄, 中科院上海药物所清洁级动物房繁殖提供。除 DTH 模型采用雌性小鼠外, 其余全为雄性小鼠。雄性 SD 大鼠, 体重 130-160g, 中科院上海实验动物中心提供。DBA/1 小鼠从日本引进, 由中科院上海药物研究所 SPF 级动物房繁育提供。动物饲养于中科院上海药物所
 15 清洁级动物房, 12 小时光/暗循环, 24°C 室温, 50-60%湿度。

试剂:

卡介苗购自卫生部上海生物制品研究所, 批号: 200109001。

牛 II 型胶原蛋白购自日本, 批号: 40418N。

山地明(环孢素注射液, 50mg/ml)由瑞典 Novartis 制药厂生产, 批号: 143MFD0600。

- 20 ELISA 试剂盒为 Pharmegen 公司产品。

刀豆蛋白 A(Concanavalin A, ConA), 细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS), DMSO 为 Sigma 公司产品。

金黄色葡萄球菌菌体 Sac(Staphylococcus aureus Cowan strain 1) 为 Biosciences 公司产品。

RPMI-1640 培养液及小牛血清为 GIBCOL 公司产品。

- 25 [³H]-胸腺嘧啶核苷为上海原子能研究所产品, 其余试剂均为国产分析纯。

试验例 1 非特异性淋巴细胞毒性实验

实验方法:

(1) 脱脊椎处死小鼠, 无菌取其脾脏, 磨碎制成单细胞悬液, 去除红细胞后, 用含

10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞浓度调成 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。

(2) 于 96 孔板中加入 $90 \mu\text{l}$ 的细胞悬液, $45 \mu\text{l}$ 的样品, $45 \mu\text{l}$ 含 10% 血清的培养液; 对照加 $90 \mu\text{l}$ 此培养液, 总体积为 $180 \mu\text{l}$ 。并设空白对照。

(3) 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 48 小时。在结束培养前 6-7 小时, 每孔加 MTT $18 \mu\text{l}$ 。

5 (4) 结束培养时, 每孔加溶解液 $90 \mu\text{l}$, 在培养箱中放置 6-7 小时后, 用酶标仪于 570nm 处测定 OD 值。

实验结果:

雷公藤内酯醇(LLDT-2)的 IC_{50} 为 0.74ng/ml ($R=0.991$) *; 根据 LLDT-2 的 FW 为 360, 换算成摩尔浓度 LLDT-2 的 IC_{50} 约为 2nM , (见图 1)。

10 (5R)-5-羟基雷公藤内酯醇(LLDT-8)的 IC_{50} 为 78.2ng/ml ($R=0.983$); 根据 LLDT8 的 FW 为 376, 换算为摩尔浓度 LLDT-8 的 IC_{50} 约为 208nM , (见图 2)。

*计算软件: GraphPAD InPlot。采用非线性回归法。

试验例 2 抑制 ConA 或 LPS 诱导的淋巴细胞增殖反应

15 实验方法:

(1) 脱颈椎处死小鼠, 无菌取其脾脏, 磨碎制成单细胞悬液, 去除红细胞后, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞浓度调成 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。

(2) 于 96 孔板中加入 $100 \mu\text{l}$ 的细胞悬液, $50 \mu\text{l}$ 的样品, $50 \mu\text{l}$ ConA 或 LPS, 对照加 $50 \mu\text{l}$ 含 10% 血清的培养液。总体积为 $200 \mu\text{l}$ 。

20 (3) 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 48 小时。在结束培养前 7-8 小时, 每孔加 ^3H 稀释液 $25 \mu\text{l}$ (即, $1.9 \times 10^{10}\text{Bq}$ 的 $[^3\text{H}]$ -胸腺嘧啶核苷)。

(4) 在培养时间达到 48 小时, 将 ConA 作用的培养板冻存于 -20°C 冰箱; 再过 12 小时, 将 LPS 作用的培养板冻存于 -20°C 冰箱。

25 (5) 用细胞收集仪(HARVESTER96[®], TOMTEC)收集细胞于玻璃纤维膜上, 用液闪记数仪(MicroBeta Trilux[®], PerkinElmer)检测 DNA 对 $[^3\text{H}]$ -胸腺嘧啶核苷的掺入量, 反映细胞增殖情况。

实验结果:

本发明的化合物对 ConA 诱导的小鼠 T 淋巴细胞增殖反应有明显的抑制作用。例如,

LLDT-8 抑制 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖反应的 ED_{50} 为 58.12ng/ml ($R=0.998$), 其摩尔浓度的 ED_{50} 为 154.6nM (图 3), 低于其 IC_{50} 为 200nM 的淋巴细胞毒性; 而 LLDT-2 抑制 T 淋巴细胞增殖反应的 ED_{50} 为 2.44ng/ml ($R=0.998$), 其摩尔浓度的 ED_{50} 为 6.8nM (图 4), 高于其 IC_{50} 为 2nM 的淋巴细胞毒性, 这表明 LLDT-8 抑制 T 淋巴细胞增殖反应的有效比活性明显好于母体化合物 LLDT-2。LLDT-8 与临床常用免疫抑制药物环孢霉素(Cyclosporine, CsA) 相比, 其抑制活性比 CsA 的抑制活性弱 5.4 倍。CsA 的 ED_{50} 为 34.62ng/ml ($R=0.998$), 根据 CsA 的 FW 为 1202.6, 换算为摩尔浓度 CsA 的 ED_{50} 约为 28.8nM, (图 5)。

本发明化合物对 LPS 诱导的小鼠 B 淋巴细胞增殖反应也有明显的抑制作用。例如, LLDT-8 抑制 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖反应的 ED_{50} 为 59.80ng/ml ($R=0.998$), 其摩尔浓度的 ED_{50} 为 159nM (见图 6), 低于其 IC_{50} 为 200nM 的淋巴细胞毒性; 而 LLDT-2 抑制 B 淋巴细胞增殖反应的 ED_{50} 为 2.38ng/ml ($R=1$), 其摩尔浓度的 ED_{50} 为 6.6nM (见图 7), 高于其 IC_{50} 为 2nM 的淋巴细胞毒性, 这表明 LLDT-8 抑制 B 淋巴细胞增殖反应的有效比活性也明显好于母体化合物 LLDT-2。LLDT-8 与 CsA 相比, 其抑制活性比 CsA 的抑制活性强约 4.3 倍。CsA 的 ED_{50} 为 816.7ng/ml ($R=0.989$), 其摩尔浓度的 ED_{50} 为 679nM (见图 8)。

以上的实验研究结果也证实了现有技术的 LLDT-2 有非常强的非特异性细胞毒性作用, 它虽然有强烈的免疫抑制活性, 但其抑制活性依赖于细胞毒性作用, 甚至有效半数使用量的 ED_{50} 还要比其细胞毒性的 IC_{50} 要高, 所以显然没有实用价值。

下表 1 是本发明的若干化合物非特异性淋巴细胞毒性和淋巴细胞增殖实验结果汇总。

表 1 雷公藤二萜类内酯结构类似物的免疫生物活性

样品	测定浓度 (M)	细胞毒性	T 细胞增殖	B 细胞增殖
		OD 值	CPM 值	CPM 值
对照		0.337	125789	87373
LLDT-15	10^{-8}	0.327	69613	77139
	10^{-7}	0.316	63914	85240
	10^{-6}	0.156	10296	30889
LLDT-16	10^{-8}	0.372	89029	71877
	10^{-7}	0.337	75599	82285
	10^{-6}	0.304	76204	80768
LLDT-17	10^{-8}	0.334	74069	73969
	10^{-7}	0.355	67561	76376
	10^{-6}	0.310	84825	82861
LLDT-18	10^{-8}	0.367	92807	79808
	10^{-7}	0.295	53513	75147
	10^{-6}	0.039	462	833

LLDT-19	10^{-8}	0.346	76183	69690
	10^{-7}	0.340	71177	70587
	10^{-6}	0.340	79418	82989
LLDT-20	10^{-8}	0.374	69785	78259
	10^{-7}	0.350	54771	85145
	10^{-6}	0.263	25344	63169
LLDT-21	10^{-8}	0.359	83465	76181
	10^{-7}	0.332	73513	75766
	10^{-6}	0.361	97217	86610
LLDT-22	10^{-8}	0.374	64367	84748
	10^{-7}	0.345	68787	89706
	10^{-6}	0.157	2662	16807
LLDT-23	10^{-8}	0.366	84713	76993
	10^{-7}	0.349	104791	86481
	10^{-6}	0.302	55614	99672

试验例 3 抑制同种异体混合淋巴细胞增殖反应 (MLR)

实验方法:

(1) 脱脊椎处死 C57BL/6 和 Balb/c 小鼠, 无菌取其脾脏, 磨碎制成单细胞悬液, 去除红细胞后, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞浓度调成 $6 \times 10^6/\text{ml}$ 。

(2) C57BL/6 脾细胞为反应细胞, Balb/c 脾细胞 (经钴 60 照射, 3000 rads) 为刺激细胞, 两种细胞等体积混合。

(3) 于 96 孔板中加入细胞混合液 $100 \mu\text{l}$, 样品 $100 \mu\text{l}$, 对照加 $100 \mu\text{l}$ 含 10% 血清的培养液。并做两种细胞的单独培养对照。

(4) 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 3, 4, 5 天。在结束培养前 1 天, 加入 ^3H 稀释液 $25 \mu\text{l}$ (即, $3.8 \times 10^6 \text{Bq}$ 的 $[\text{H}]$ -胸腺嘧啶核苷)。

(5) 结束培养时, 将培养板冻存于 -20°C 冰箱。

(6) 细胞收集仪 (HARVESTER96[®], TOMTEC) 收集细胞于玻璃纤维膜上, 用液闪记数仪 (MicroBeta Trilux[®], PerkinElmer) 检测 DNA 对 $[\text{H}]$ -胸腺嘧啶核苷的掺入量, 反映细胞增殖情况。

实验结果:

LLDT-8 能抑制 BALB/C 抗 C57BL/6 的混合淋巴细胞增殖反应, 作用约比 CsA 强 2.5 倍。

LLDT-8 的 ED_{50} 为 0.6ng/ml , 其摩尔浓度的 ED_{50} 为 1.6nM (见图 9)。

CsA 的 ED_{50} 为 4.9ng/ml , 其摩尔浓度的 ED_{50} 为 4.1nM (见图 10)。

试验例 4 对淋巴细胞细胞因子产生的影响

实验方法:

(1) 脱脊椎处死小鼠, 无菌取其脾脏, 磨碎制成单细胞悬液, 去除红细胞后, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞浓度调成 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。

(2) 于 24 孔板中加入细胞悬液 1ml, 样品及 ConA (终浓度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 或 Sac (终浓度 0.01%) 各 0.5 ml, 对照加 0.5ml 含 10% 小牛血清的培养液, 终体积 2ml。

(3) 37°C , 5% CO_2 的培养箱中培养 24 或 48 小时后, 收集培养上清, 冻存于 -20°C 冰箱, 细胞因子待测。

(4) 双抗夹心酶联免疫吸附实验 (ELISA 法) 检测细胞因子的产生, 以 TMB 作为酶反应底物, OD450nm 检测吸光度, 根据标准曲线换算样品细胞因子生成量。

实验结果:

本发明的化合物对 T 淋巴细胞 $\text{IFN-}\gamma$ 的产生有很强的抑制作用, 对 IL-2 的产生也有抑制作用; 并抑制巨噬细胞的细胞因子 IL-12, $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 的产生, 但增强 IL-10 的产生。本发明的化合物明显地支持 Th2 类型的细胞因子 IL-10 的产生, 抑制 Th1 类型的细胞因子产生, 对细胞介导免疫反应产生抑制效应。

例如, LLDT-8 在大大低于其淋巴细胞毒性 IC_{50} 的浓度下, 强烈抑制被 SAC 激活的小鼠脾淋巴细胞产生 $\text{IFN-}\gamma$, 甚至在 0.01nM 的浓度时仍有抑制作用 (见表 2)。

表 2 抑制 SAC 激活的淋巴细胞产生 $\text{IFN-}\gamma$

LLDT-8 浓度 (nM)	Sac 激活的淋巴细胞产生 $\text{IFN-}\gamma$	
	平均值 (pg/ml)	SD
—	1302.6	18.18
100	227.4	14.91
10	465.3	10.74
1	810.3	57.03
0.1	850.5	0
0.01	809.7	28.50

LLDT-8 还抑制 ConA 诱导的淋巴细胞 IL-2 的产生 (见表 3)。

表 3 抑制 ConA 诱导的淋巴细胞 IL-2 的产生

LLDT-8 浓度 (nM)	Con 诱导的淋巴细胞 IL-2 的产生	
	平均值 (pg/ml)	SD
—	3724.4	139.2
30	2872.7	24.7
3	3494.2	16.5
0.3	3857.2	172.5

LLDT-8 还抑制 SAC 激活的淋巴细胞产生细胞因子 IL-12, TNF- α 和 IL-6 的产生, 增强 IL-10 (表 4)。

5

表 4 对 SAC 激活的淋巴细胞细胞因子产生的影响

LLDT-8 浓度 (nM)	Sac 激活的淋巴细胞淋巴因子的产生			
	IL-10	IL-12	TNF- α	IL-6
—	2306	980	4062	1528
30	3262	602	3649	989
3	2816	939	3899	1403
0.3	2866	917	4686	1585

试验例 5 诱导 T 淋巴细胞凋亡

实验方法:

- (1) 培养液孵育 Tuf-Tainer (对细胞无粘附性) 2 小时;
- (2) 同增殖实验, 取 Balb/c 小鼠脾脏细胞, 制成单细胞悬液, 调成 $5 \times 10^6/\text{ml}$;
- (3) 加入所需的细胞数和 5mg/ml ConA 或培养液;
- (4) 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养一定时间 (24-96 小时);
- (5) 反应结束后, PBS 洗细胞, 离心, 4°C , $400\text{g} \times 10\text{min}$;
- (6) 剧烈震荡 10 秒, 缓慢加入 1ml 冰冷 70%乙醇, 盖上盖子, 4°C 冰箱固定过夜;
- (7) 离心 $3000\text{rpm} \times 5\text{min}$, 弃乙醇, 加入 1ml PI 染液, 室温放置 $>30\text{min}$;
- (8) 24 小时内上 FACs 检测。

实验结果:

现有的实验结果显示本发明化合物在低于或接近细胞毒性 IC_{50} 浓度时具有诱导小鼠 T 淋巴细胞发生凋亡的作用, 并能降低 CD4^+ 和 CD8^+ T 淋巴细胞比例, 这可能是其发挥抗炎免疫抑制作用的机制之一。

试验例 6 抑制 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应 (DTH)

实验方法:

(1) Balb/c 小鼠(雌性, 6-8 周龄), 每只后脚以 $20 \mu\text{l}$ 0.5% DNFB 致敏, 次日加强(DNFB 溶于[丙酮: 橄榄油=4: 1]油剂中);

5 (2) 第 7-9 天, 鼠左耳内外两侧各 $10 \mu\text{l}$ 0.4% DNFB 进行攻击;

(3) 攻击前 1 小时腹腔注射或灌胃一次, 12 小时后再给药一次;

(4) 攻击后 24-48 小时, 检测各指标。

注: ICR 小鼠 (雌性, 6-8 周龄), 致敏剂浓度为 0.7%, 攻击剂浓度为 0.6%。

实验结果:

10 在经典的 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应 (DTH) 模型上, 检测了本发明化合物是否对细胞介导免疫反应具有免疫抑制活性作用。结果证明, 经由腹腔注射和口服灌胃两个给药途径, LLDT-8 对 DTH 反应具有非常强烈的抑制作用。

1. 腹腔注射 LLDT-8 抑制 DTH 反应:

15 LLDT-8 腹腔给药量 1mg/kg , 每日一次, 共 5 次, 明显抑制 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应, 对细胞介导的免疫反应 DTH 的抑制活性与环孢霉素 10mg/kg 用药量比, LLDT-8 的抑制作用明显地强于环孢霉素的作用。LLDT-8 1mg/kg/d 实验组对淋巴器官 (脾脏) 及体重没有明显影响 (见表 5)。

表 5 对 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的抑制作用(i.p.)

实验组	剂量 (mg/kg)	左耳重	右耳重	耳重差 (mg)	给药前/后 体重 (g)	脾重 (mg)
对照组	—	63.8	31.2	32.6	20/20	142.4
CsA	10	59.0	32.3	26.7	21/20	152.3
LLDT-8	1	56.9	35.5	21.4	21/21	140.3

20 • BALB/C 小鼠, $n=11-12$ 。

降低 LLDT-8 的使用剂量和次数, 1mg/kg , 0.2mg/kg , 0.04mg/kg , 每日一次, 共 2 次, LLDT-8 对 DTH 的抑制活性与环孢霉素 10mg/kg 同样有很强的免疫抑制效应(见表 6)。

表 6 对 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的抑制作用(i.p.)

实验组	剂量 (mg/kg)	左耳重	右耳重	耳重差 (mg)
对照组	—	61.1	30.0	31.1
CsA	10	55.6	32.5	23.1
LLDT-8	1	56.4	33.0	23.4
LLDT-8	0.2	55.3	37.4	17.9
LLDT-8	0.04	55.5	29.4	26.1

• ICR 小鼠, n=5。

降低 LLDT-8 的使用剂量到 2 μ g/kg 时, 仍有显著的抑制 DTH 反应的效应, 似乎低剂量时 LLDT-8 呈现出更强烈的免疫抑制效应 (见表 7)。

5

表 7 对 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的抑制作用(低浓度 i.p.)

实验组	剂量 (μ g/kg)	左耳重	右耳重	耳重差 $\bar{X} \pm SD$ (mg)
对照组	—	49.6	26.3	23.3 \pm 4.3
LLDT-8	200	44.3	27.2	17.1 \pm 5.1*
LLDT-8	40	42.6	25.7	16.9 \pm 2.7**
LLDT-8	8	46.3	29.7	16.6 \pm 4.1**
LLDT-8	2	44.3	27.5	16.8 \pm 5.4**

• 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01; • BALB/c 小鼠, n=12。

超低浓度的 LLDT-8 在 0.4 μ g/kg 使用剂量时, 仍有显著的抑制 DTH 反应的效应, 并与 CTX 在 1mg/kg 和 LLDT-2 在 40 μ g/kg 时的抑制效应相近 (见表 8)。

10

表 8 对 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的抑制作用 (超低浓度 i.p.)

实验组	剂量 (μ g/kg)	左耳重	右耳重	耳重差 $\bar{X} \pm SD$ (mg)	给药前/后 体重 (g)	脾重 (mg)
对照组	—	49.1	26.4	22.7 \pm 2.1	22.4/21.9	154.0
CTX	1000	45.9	30.3	15.6 \pm 8.1*	22.1/21.1	141.2
LLDT-2	40	47.9	30.2	17.7 \pm 5.7	21.5/21.2	151.4
LLDT-8	40	46.7	29.6	17.1 \pm 4.9**	21.6/21.4	168.5
LLDT-8	4	42.1	26.8	15.3 \pm 4.6**	21.4/21.8	163.3
LLDT-8	0.4	47.0	29.2	17.7 \pm 4.7*	22.3/22.6	164.2

- 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01;
- BALB/c 小鼠, n=10。

2. 口服给药 LLDT-8 抑制 DTH 反应:

在对 DNFB 诱导的小鼠 DTH 反应中, 口服给药 LLDT8, 1mg/kg, 每日一次, 共 2 次

5 就能显著地抑制 DTH 这一细胞介导的免疫反应 (见表 9)。

表 9 对 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的抑制作用(p.o.)

实验组	剂量 (mg/kg)	左耳重	右耳重	耳重差 (mg)	给药前/后 体重 (g)	脾重 (mg)
对照组	—	49.3	25.9	23.4	20/19	125.8
CsA	10	33.4	25.7	7.7	20/18	123.0
LLDT-2	0.2	41.2	24.5	16.7	21/20	127.0
LLDT-8	1	40.4	27.3	13.1	21/21	124.4

• BALB/c 小鼠, n=5-6。

低浓度的 LLDT-8 在口服给药时, 仍有显著的抑制效应。40 μ g/kg 的 LLDT-8 与 4mg/kg

10 的 CsA 在口服给药时的免疫抑制活性强度相当 (见表 10)。

表 10 对 DNFB 诱导的小鼠迟发性超敏反应的抑制作用(p.o.)

实验组	剂量 (mg/kg)	左耳重	右耳重	耳重差 (mg)
对照组	—	75.2	33.7	41.5
CsA	4	72.5	39.8	32.7
LLDT-8	1	63.5	39.4	24.1
LLDT-8	0.2	68.2	38.2	30.0
LLDT-8	0.04	69.0	35.2	33.8

• ICR 小鼠, n=5-6。

15 试验例 7 抑制小鼠 B 细胞抗羊红细胞特异性抗体的产生

实验方法:

- (1) 新鲜羊红细胞(SRBC)经 pH7.2 PBS 洗 3 次, 1: 20 稀释;
- (2) 新鲜豚鼠血清 1: 10 稀释;
- (3) 配制 2×10^7 /ml 小鼠脾脏细胞悬液;

(4) 三者分别取 1ml 混合, 37° C, 1.5 小时; 2500rpm×15 分钟离心, 取上清, 520nm 测 OD 值。

小鼠在给药后第三天致敏: 将羊红细胞用生理盐水洗涤三次, 按 5% 比例稀释 SRBC 压积, 每只小鼠腹腔注射 0.2ml, 于致敏后第六天解剖取脾脏细胞测定其抗体生成量。

5 实验结果:

本发明化合物不仅对细胞介导的免疫反应有抑制作用, 而且对体液免疫反应也有抑制作用。在羊红细胞诱导的小鼠 B 细胞抗羊红细胞特异性抗体生成的实验中, LLDT-8 明显地抑制 B 细胞抗羊红细胞特异性抗体的生成, 在腹腔给药 40μg/kg 的低剂量时, 仍有显著的抑制效应; CsA 主要是抑制 T 细胞的功能, 对 B 细胞抗羊红细胞特异性抗体的生成没有抑制效应; LLDT-8 和 CsA 一样有降低血清总 IgG 抗体的浓度; LLDT-8 腹腔给药明显地升高血清补体 C3 的浓度, 表示机体提高了对免疫复合体的清除能力, LLDT-8 和 CsA 一样具有免疫抑制剂常有的这一特征 (见表 11)。

表 11 对小鼠 B 细胞抗羊红细胞特异性抗体产生的抑制作用(i.p.)

实验组	剂量 (mg/kg)	QHS OD 值	血清 IgG (μg/10 μ l)	血清 C3 (μg/10 μ l)	体重 (g)	脾重 (mg/10g)	胸腺重 (mg)
对照组	—	0.208	185.5	16.8	23.5	66.4	39.6
CsA	4	0.247	173.9	19.1	22.9	65.6	31.8
LLDT-8	1	0.158	182.9	19.4	22.3	59.6	36.6
LLDT-8	0.2	0.162	165.9	19.7	23.1	76.3	36.9
LLDT-8	0.04	0.175	176.6	19.5	23.0	74.8	32.1

15 • ICR 小鼠, 雌性, 6-8 周龄, 每组动物数 8 只, 腹腔注射给药, 共 4 次;

• QHS 为 PFC 的改良检测法。

LLDT-8 在口服给药 40μg/kg 的低剂量时, 也同样对 B 细胞抗羊红细胞特异性抗体的生成有显著的抑制效应, 但对血清抗体总 IgG 和血清补体 C3 的浓度没有明显的影响作用 (见表 12)。

表 12 对小鼠 B 细胞抗羊红细胞特异性抗体产生的抑制作用(p.o.)

实验组	剂量 (mg/kg)	QHS OD 值	血清 IgG ($\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)	血清 C3 ($\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)	体重 (g)	脾重 (mg/10g)	胸腺重 (mg)
对照组	—	0.38	117	7.9	23.4	55.7	28.8
CTX	4	0.12	101	7.5	22.6	50.7	28.2
LLDT-8	1	0.24	118	6.8	23.0	63.7	32.5
LLDT-8	0.2	0.34	116	7.9	24.0	61.6	36.6
LLDT-8	0.04	0.23	123	6.7	23.0	69.0	28.7

• ICR 小鼠，雌性，6-8 周龄，每组动物数 8 只，口服给药，共 4 次，但阳性对照药 CTX 为腹腔给药。

5 试验例 8 对佐剂性大鼠关节炎的防治作用

1. 佐剂性大鼠关节炎动物模型的诱发及防治

雄性 SD 大鼠 60 只，随机分成 5 组，将灭活的 BCG 用灭菌的液体石蜡配成 10g/L，震荡混匀，皮内注射 0.1ml 于大鼠左后足垫内。注射后连续观察 28 天，以注射对侧继发性足肿胀为关节炎发生的指征。从第 12 天起每隔四天用排水法测踝关节以下足体积。同时，对多发性关节炎病变的严重程度按以下标准进行评分：0：无红肿；1：小趾关节稍肿；2：趾关节和足跖肿胀；3：踝关节以下的足爪肿胀；4：包括踝关节在内全部足爪肿胀。每只大鼠的最大得分为 16。

在佐剂诱导关节炎的前两天开始腹腔注射给药，LLDT-8 用量为 3mg/kg/天、1mg/kg/天、0.2mg/kg/d 和 CsA 10 mg/kg/天，一直持续至免疫后第 28 天。从第 12 天开始每天对大鼠多发性关节炎进行评分，并且每隔 4 天对继发性关节炎的病征情况进行评估，右足继发性关节炎和对四肢踝关节以下足体积进行测定。

淋巴细胞增殖实验：大鼠免疫第 28 天，处死后无菌取其脾脏，磨碎制成单细胞悬液，去除红细胞后，用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞浓度调成 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。于 96 孔板中加入 100 μl 的细胞悬液，100 μl ConA 或 LPS，对照加 100 μl 含 10% 血清的培养液，总体积为 200 μl 。37° C，5% CO₂ 培养箱中培养 48 小时。在结束培养前 7-8 小时，每孔加 ³H 稀释液 25 μl （即， 1.9×10^{10} Bq 的 [³H]-胸腺嘧啶核苷）。在培养时间达到 48 小时后，用细胞收集仪(HARVESTER96[®], TOMTEC)收集细胞于玻璃纤维膜上，用液闪记数仪(MicroBeta Trilux[®], PerkinElmer)检测 DNA 对 [³H]-胸腺嘧啶核苷的掺入量，反映细胞增

殖情况。

脾脏淋巴细胞因子诱导：大鼠免疫第 28 天，乙醚麻醉处死，无菌取其脾脏，磨碎制成单细胞悬液，去除红细胞后，用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞浓度调成 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。于 24 孔板中加入细胞悬液 1ml，样品及 ConA(终浓度 $5\mu\text{g}/\text{mL}$) 1 ml，对照加 1ml 含 10% 血清的培养液，终体积 2mL。37°C，5%CO₂ 培养箱中培养 24 或 48 小时后，收集培养上清，冻存于 -20°C 冰箱，细胞因子待测。

大鼠腹腔巨噬细胞的获取及细胞因子诱导：大鼠免疫第 28 天，乙醚麻醉处死，无菌取其腹腔巨噬细胞，洗去非粘附细胞后，加入含 LPS (终浓度 $5\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 RPMI1640 培养液 1 ml，对照加 1ml 含 10% 血清的培养液。37°C，5%CO₂ 培养箱中培养 6，24 或 48 小时后，收集培养上清，冻存于 -20°C 冰箱，细胞因子待测。

实验结果表明：LLDT8 对大鼠佐剂性关节炎的右足继发性关节炎肿胀有非常明显的防治作用。用量为 3mg/kg/d，1mg/kg/d，0.2mg/kg/d 的 LLDT-8 防治组和 10 mg/kg/d 的 CsA 对照组均可明显抑制佐剂性关节炎引起的大鼠继发性足肿胀，各剂量组的 LLDT-8 防治组的防治效果与 10 mg/kg/d 的 CsA 对照组相等（见图 11）和（见图 12）。

病理学诊断的检查也证实了各剂量组的 LLDT-8 防治组和 CsA 对照组都有显著的抑制炎症细胞对关节组织的浸润，保护关节腔滑膜完整，防止关节腔的粘连和骨质破坏。

LLDT-8 对大鼠佐剂性关节炎四肢多发性病变的防治作用评估表明，3mg/kg/d，1mg/kg/d，0.2mg/kg/d 的 LLDT-8 防治组和 10 mg/kg/d 的 CsA 对照组均可明显改善大鼠多发性关节炎病变症状。1mg/kg/d，0.2mg/kg/d 的 LLDT-8 防治组对佐剂诱导的原发性（左）足爪肿胀的防治作用较弱故影响了评定的总指数，但 3mg/kg/d 的 LLDT-8 防治组对原发性左足爪肿胀有非常明显的抑制作用，防治效果与 10 mg/kg/d 的 CsA 对照组相等（见图 13）。

LLDT-8 在长达 30 天对大鼠佐剂性关节炎的治疗中有防止体重减轻的作用，从第 12 天起未治疗模型组的大鼠体重开始明显下降，3mg/kg/d，1mg/kg/d，0.2mg/kg/d 的 LLDT-8 防治组和 10 mg/kg/d 的 CsA 对照组均可明显改善关节炎导致的大鼠体重减轻（见图 14）。

LLDT-8 抑制 LPS 诱导的大鼠 B 淋巴细胞增殖反应，3mg/kg/d，1mg/kg/d，0.2mg/kg/d 的 LLDT-8 防治组和 10 mg/kg/d 的 CsA 对照组的大鼠 B 淋巴细胞对 LPS 诱导的增殖反应性明显降低（见图 15）。

2. 对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用：

灭活的 BCG 用灭菌的液体石蜡配成 10g/L，震荡混匀，皮内注射 0.1ml 于大鼠左后足跖内。注射后直至关节炎完全形成。注射佐剂一侧足跖从第一天起持续肿胀 4 天，而后消

肿, 于第八天起再次持续肿胀, 第十六天达最高。继发性反应于 12 天发生, 主要表现为注射佐剂对侧足跖肿胀, 尾部、耳部、及前肢关节也有不同程度的肿胀。对多发性关节炎病变的严重程度按以下标准进行评分: 0: 无红肿; 1: 小趾关节稍肿; 2: 趾关节和足跖肿胀; 3: 踝关节以下的足爪肿胀; 4: 包括踝关节在内全部足爪肿胀。

- 5 动物分级及给药: 注射佐剂后第 19 天, 关节炎大鼠继发病变反应趋于稳定, 全身病变也较明显。将上述大鼠随机分成 6 组, 每组 8 只, 即, 佐剂(AA)对照组(8 只), LLDT-8 2mg/kg (8 只), LLDT-8 1mg/kg (8 只), LLDT-8 0.5mg/kg (8 只), LLDT-8 0.25mg/kg (8 只), CsA 10mg/kg (8 只)。连续给药 14 天, 每隔 3 天测量右足体积并根据病变情况评分。给药后第 15 天处死大鼠, 解剖取胸腺和脾脏称重, 测定脏器指标。

10 实验结果:

LLDT-8 对大鼠佐剂性关节炎的继发性足肿胀有一定的治疗作用。注射佐剂后 19 天, 右后足跖肿胀显著, 继发病变形成。LLDT-8 在较高浓度 2mg/kg/d 时, 给药 6 天后可见肿胀稍有消退, 12 天后足跖肿胀显著消退, 与模型对照组比较有非常显著性的差异, 并与 CsA 10mg/kg/d 治疗组作用相近(见图 16)。

- 15 LLDT-8 对大鼠佐剂性关节炎四肢多发性关节炎的治疗作用评估显示 2mg/kg/d, 1mg/kg/d 的 LLDT-8 治疗组均明显改善大鼠多发性关节炎病变症状, 比 10 mg/kg/d 的 CsA 对照组的疗效弱(见图 17)。

试验例 9 对牛 II 型胶原诱导的小鼠关节炎的治疗作用

20 实验方法:

1. DBA/1 小鼠关节炎的诱导及症状评定

- 牛 II 型胶原于实验前一天溶解于 0.1M 醋酸中, 实验当天将含 *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv 的 CFA 与胶原充分乳化后, 以 125mg 乳化剂于 DBA/1 小鼠尾基部进行致敏, 3 周后以相同剂量的乳化剂于尾部进行攻击。在攻击前一天开始进行连续 25 周的腹腔给药治疗。关节病变的严重程度通过评分决定, 每一肢体关节炎评分指数在 0 到 6 分之间, 结果以四肢评分总和的平均值形式表示。

2. 细胞增殖及细胞因子的产生

- a. 无菌制备外周淋巴结或脾脏单个细胞悬液。
b. 于 96 孔板中, 每孔加入 $100\mu\text{l} \times 10^6/\text{ml}$ 细胞, 并同时加入 $100\mu\text{l}$ 胶原或培养液
30 作为刺激剂, 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 3, 4, 5 天。在结束培养前 24 小时, 每孔加

[³H]-胸腺嘧啶核苷稀释液 25 μ l (即 1.9×10^{10} Bq)。

c. 培养结束后, 将 96 孔板冻存于 -20°C 冰箱。

d. 用细胞收集仪(HARVESTER96®, TOMTEC)收集细胞于玻璃纤维膜上, 用液闪记数仪 (MicroBeta Trilux®, PerkinElmer) 检测 DNA 对 [³H]-胸腺嘧啶核苷的掺入量, 反映细胞增殖情况。

3. 抗胶原抗体的免疫测定(ELISA 方法)

a. 包被平板: 50mg/ml 胶原每孔 50 μ l 包被 96 孔酶标板, 于 37°C 作用 1 小时。结束后用 PBS 洗 3 次;

b. 加标准品及样品: 每孔 50 μ l, 室温反应 1 小时。结束后用 PBS 洗 3 次;

c. 加酶: rabbit-anti-mouse-IgG(H+L) coupled to HRP (1:2000) 每孔 50 μ l, 室温反应 30 分钟。结束后用 PBS 洗 3 次;

d. 加底物显色: 柠檬酸+TMB+H₂O₂, 每孔 100 μ l, 室温反应 15 分钟;

e. 终止: 1 M H₂SO₄, 每孔 50 μ l; 测 OD 值: 于酶标仪上以双波长 450nm 和 570nm 测定 OD 值。

g. 计算: 根据所设标准品, 计算血清中抗胶原特异性抗体的生成量。

实验结果:

牛 II 型胶原诱导 DBA/1 小鼠关节炎模型的发病情况与人类风湿性关节炎相似, 1mg/kg/d 的 LLDT-8 腹腔注射给药与模型对照组相比, LLDT-8 非常显著地抑制关节炎的发生, 显示了良好的防治效果 (见图 18) 和 (见图 19)。

在 0.2mg/kg/d 和 0.04mg/kg/d 较低浓度的 LLDT-8 腹腔注射给药时, 与模型对照组相比, 呈剂量依赖性地抑制或缓解关节炎病变的发生, 显示了有效的治疗作用 (见图 20)。

检测经 LLDT-8 治疗后的关节炎小鼠血清中抗牛 II 型胶原特异性抗体的生成情况, 研究发现 LLDT-8 治疗各组血清中抗牛 II 型胶原特异性抗体的产生与模型对照组相比, 呈剂量依赖性的抑制关节炎小鼠血清中特异性抗体的产生。这表明了 LLDT-8 对体液免疫反应有很好的抑制作用 (见图 21)。

试验例 10 在小鼠同种异体皮肤移植中的作用

实验方法:

1. 无菌环境中处死 C57 BL/6 小鼠, 于尾部腹面纵向切开, 取下尾巴, 剥皮, 平铺置于培养

皿中 PBS 湿润的滤纸上, 切成所需大小皮片;

2. 盐酸氯氨酮麻醉 Balb/c 小鼠,在背侧部去除一片毛发,形成所需手术野;
3. 于手术板上固定 Balb/c 小鼠,在背侧部去除手术野的一块皮肤,构成移植床,比将要移植的皮片稍大;
4. 将合适大小的 C57BL/6 皮片贴于移植床上,凡士林纱布贴附,并用绑带包扎紧;
5. 皮肤移植前一天开始每天腹腔给药处理;
6. 1周后去除绑带,观察皮肤移植排斥情况。当所有小鼠发生皮肤移植排斥时停止给药;
7. 移植皮片以发生完全损伤干燥为发生排斥标准。

实验结果:

- 初步的小鼠同种异体皮肤移植(C57B6 skin to BALB/c)实验结果提示了本发明化合物可延缓 BALB/c 小鼠对同种异体 C57B6 小鼠皮肤移植的排斥反应,这显示了本发明化合物可能还有希望应用于临床预防器官移植的排斥反应。

试验例 11 抗肿瘤生物活性

- 进行常规的抗肿瘤生物活性体外筛选试验,结果表明,本发明化合物对人的肿瘤细胞株: p-388 小鼠白血病*, HL-60 人白血病*, A-549 人肺腺癌, MKN-28 人胃癌, SGC-7901 人胃癌, MCF-7 人乳腺癌, BEL-7402 人肝癌, HO-8910 人卵巢癌, WI-38 人纤维细胞等有较强的抗肿瘤活性作用(见表 13)。

表 13 对人源肿瘤细胞生长的抑制作用 ($IC_{50}/\mu M$)

浓度	$IC_{50}/\mu M$								
(μM)									
细胞株	P-388	HL-60	A-549	MKN-28	SGC-7901	MCF-7	BEL-7402	HO-8910	WI-38
LLDT-8	0.080	0.081	0.032	0.39	0.043	0.35	0.085	0.22	0.48

- 细胞株: P-388 小鼠白血病, HL-60 人白血病, A-549 人肺腺癌, MKN-28 人胃癌, SGC-7901 人胃癌, MCF-7 人乳腺癌, BEL-7402 人肝癌, HO-8910 人卵巢癌, WI-38 人纤维细胞。

试验例 12 小鼠急性毒性试验

- 小鼠腹腔注射 LLDT-8 急性毒性试验

小鼠一次腹腔注射 LLDT-8, 观察即刻反应, 并连续观察 14 天, 记录死亡情况。给药当天未见死亡。死亡出现在给药后第二天, 解剖时可见心脏淤血。小鼠死亡主要发生在给

药后 2-5 天, 死亡高峰集中在第 2-4 天。雌雄小鼠死亡率无明显差异。存活小鼠第 15 天全部解剖, 肉眼检查各脏器未见明显病变。

用 Bliss 法求得 LD_{50} 为: 9.3 mg/kg; 95% 可信限为: 7.7~11.3mg/kg。

与此相比, LLDT-2 的急性毒性试验的 LD_{50} 为: 0.5 mg/kg 左右。因此, LLDT-8 的毒性大大低于其母体化合物 LLDT-2, 从而提高了可安全使用的剂量范围。

小鼠口服灌胃 LLDT-8 急性毒性试验

小鼠一次口服灌胃 LLDT-8, 观察即刻反应, 并连续观察 14 天, 记录死亡情况。给药当天未见死亡。死亡出现在给药后第二天, 解剖时可见胃幽门、十二指肠及空肠和回肠均有明显出血。小鼠死亡主要发生在给药后 2-5 天, 死亡高峰集中在第 2-3 天。雌雄小鼠死亡率无明显差异。存活小鼠第 15 天全部解剖, 肉眼检查各脏器未见明显病变。

用 Bliss 法求得 LD_{50} 为: 6.8 mg/kg; 95% 可信限为: 5.4~8.4mg/kg。

以上的实施例和试验例仅仅是举例说明本发明提供的化合物的结构及其合成方法和药理实验结果, 但对本领域的技术人员来说可以对此作出种种修改和变化, 而不背离本发明的精神和范围, 所附的权利要求书覆盖本发明范围内的所有这些修改。

产业上利用的可能性

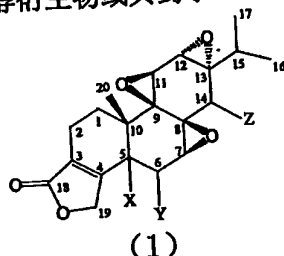
本发明以雷公藤内酯醇为起始物, 提供了新型的雷公藤二萜类内酯衍生物及相关的合成方法。

本发明的雷公藤二萜类内酯衍生物, 特别是 (5R)-5-羟基雷公藤内酯醇 (LLDT-8), 在多种体外实验系统和体内实验动物模型的研究中证实具有广泛的抗炎免疫抑制活性, 而且在体内实验中口服和腹腔给药都有非常显著的免疫抑制活性, 表现为高效低毒, 具有很好的安全治疗指数。

本发明的雷公藤二萜类内酯衍生物, 特别是 (5R)-5-羟基雷公藤内酯醇 (LLDT-8), 以及它们的组合物可作为抗炎免疫抑制剂, 用于预防和治疗自身免疫性疾病 (类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、慢性肾炎、糖尿病等), 感染性疾病 (艾滋病和病毒性肝炎等), 严重过敏性疾病, 各种皮肤疾病, 心血管系统疾病, 器官移植后的抗排斥反应, 以及抗生育等与机体免疫系统的功能及反应状态异常有关的疾病。

权 利 要 求 书



1. 通式(1)所示雷公藤内酯醇衍生物或其药学上可接受的盐或它们的光学异构体:



其中 C₅ 和 C₆ 以碳碳单键或碳碳双键相连;

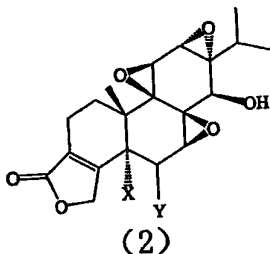
当 C₅ 和 C₆ 以碳碳单键相连时, X 和 Y 分别表示连接在 C₅ 位和 C₆ 上的氢、氧、羟基、卤素、低级烷氧基、低级烷基、巯基、低级烷巯基、式-OCOR 所示基团、-OSO₂OR 所示基团或-OPO(OH)₂ 所示基团,这里 R 表示-(CH₂)_nCO₂Na、-(CH₂)_nCO₂K 或-(CH₂)_nCH₃, n=1-6;

Z 表示连接在 C₁₄ 位上的氢、氧、羟基、卤素、低级烷氧基、低级烷基、巯基、低级烷巯基、式-OCOR 所示基团、-OSO₂OR 所示基团或-OPO(OH)₂ 所示基团这里 R 表示-(CH₂)_nCO₂Na、-(CH₂)_nCO₂K 或-(CH₂)_nCH₃, n=1-6;

在上式中, 连接 X, Y, Z 的——可代表 “” 或者 “”;

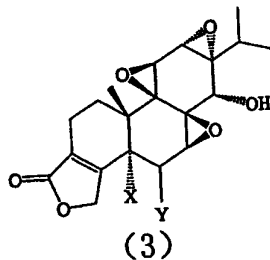
但是, X, Y 不可同时为氢原子。

2. 如权利要求 1 所述的雷公藤内酯醇衍生物, 其中 X 为 α(R)构型, Y 为 R 或 S 构型, Z = β-OH(R) 构型。

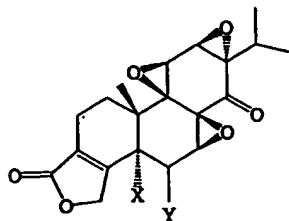


3. 如权利要求 1 所述的雷公藤内酯醇衍生物, 其中 X 为 α(R)构型, Y 为 R 或 S 构型,

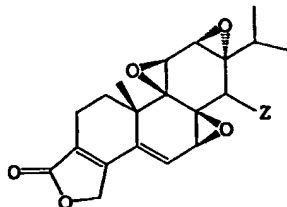
Z = α-OH(S)。



4. 如权利要求 1 所述的雷公藤内酯醇衍生物, 其中 X 为 α (R) 构型, Y 为 R 或 S 构型, Z = O。



5. 如权利要求 1 所述的雷公藤内酯醇衍生物, 其中 C₅ 和 C₆ 为双键, Z 为 R 或 S 构型或者 Z = O。



6. 如权利要求 1 所述的雷公藤内酯醇衍生物, 所述衍生物为:

(5R) -5-羟基雷公藤内酯酮;

(5R) -5-羟基雷公藤内酯醇;

10 (5R) -5-羟基表雷公藤内酯醇;

Δ 5,6-脱氢雷公藤内酯酮;

Δ 5,6-脱氢雷公藤内酯醇;

Δ 5,6-脱氢表雷公藤内酯醇;

(5R,6S) -5,6-环氧雷公藤内酯酮;

15 (5R,6S) -5,6-环氧雷公藤内酯醇;

(5R,6S) -5,6-环氧表雷公藤内酯醇;

顺式-(5R,6S) -5,6-双羟基雷公藤内酯酮;

顺式-(5R,6S) -5,6-双羟基雷公藤内酯醇; 或

顺式-(5R,6S) -5,6-双羟基表雷公藤内酯醇。

20 7. 权利要求 1 所述雷公藤内酯醇衍生物在制备抗炎剂、免疫抑制剂或治疗相关性疾病的药物上的应用。

8. 如权利要求 7 所述的应用, 其中所述相关性疾病包括自身免疫性疾病、感染性疾病、严重过敏性疾病、各种皮肤疾病、心血管系统疾病、器官移植后的抗排异反应, 以及抗生育等与机体免疫系统的功能及反应状态异常有关的疾病。

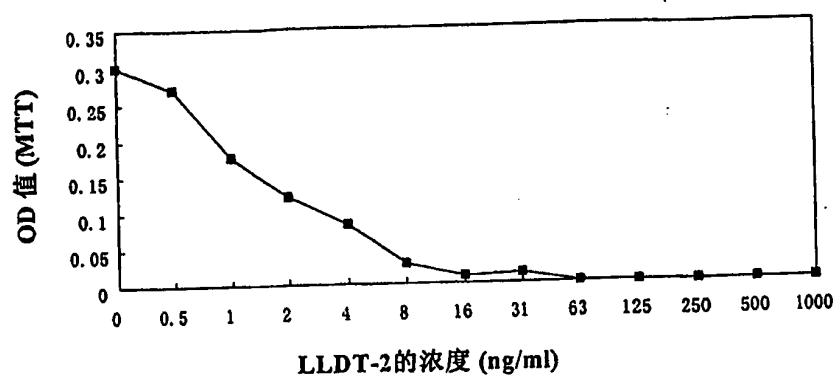


图 1

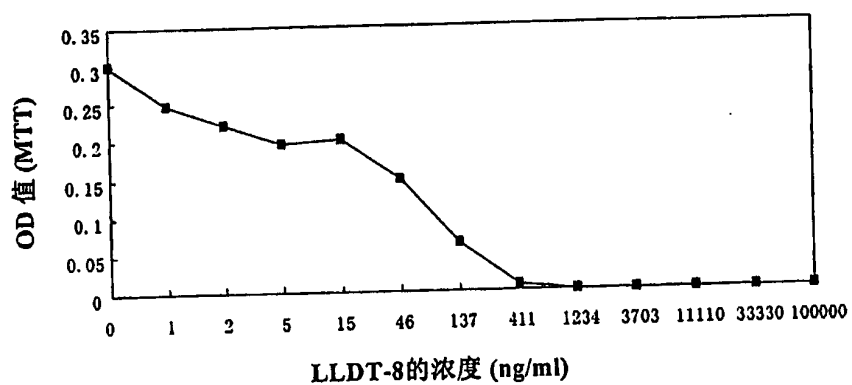


图 2

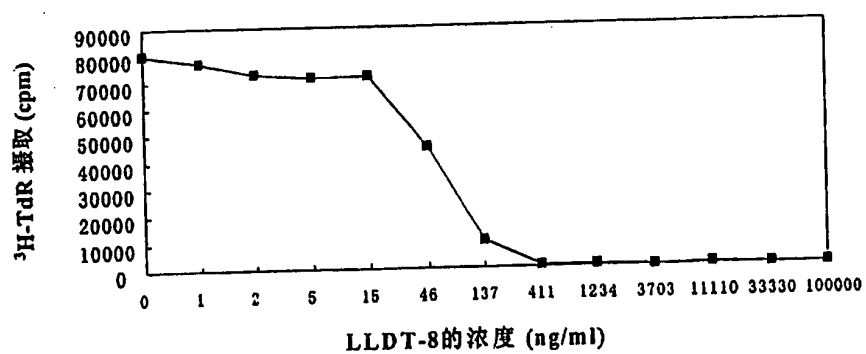


图 3

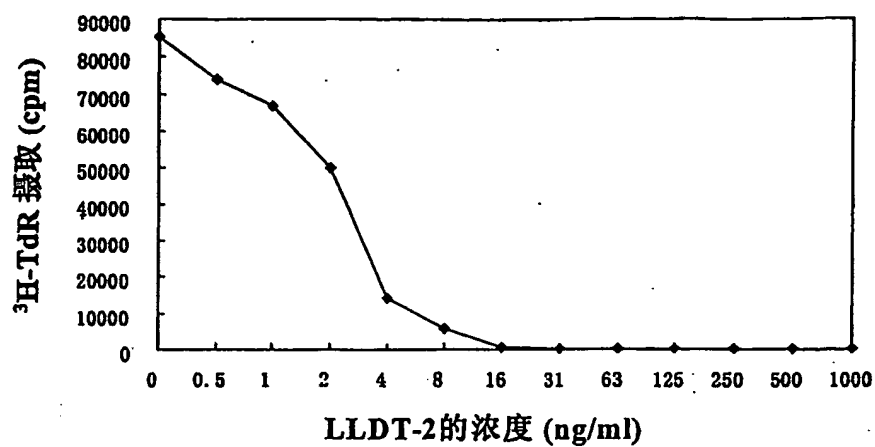


图 4

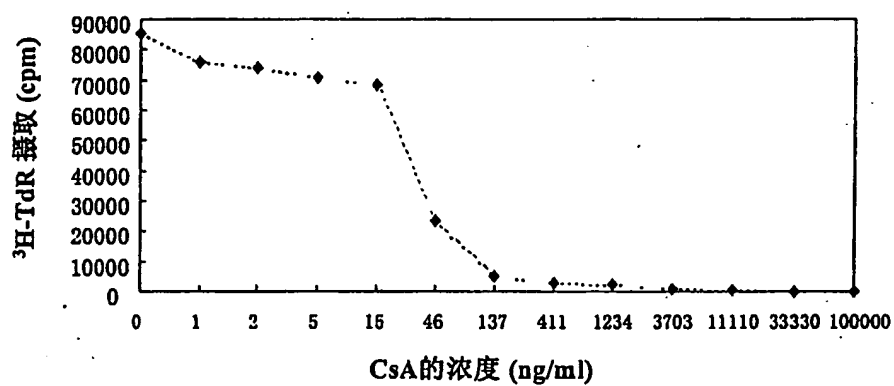


图 5

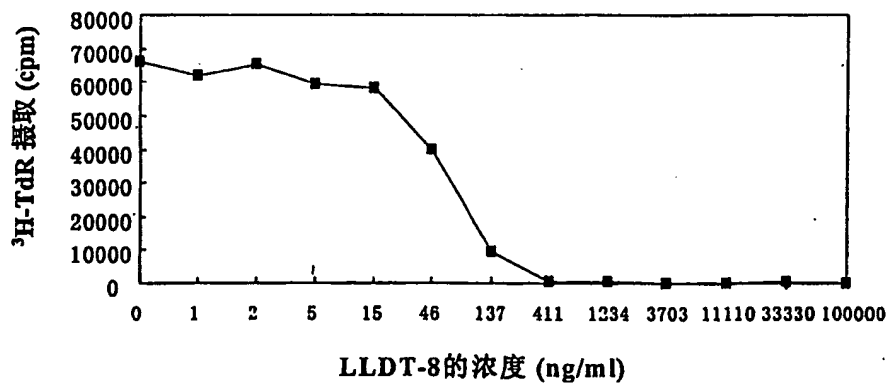


图 6

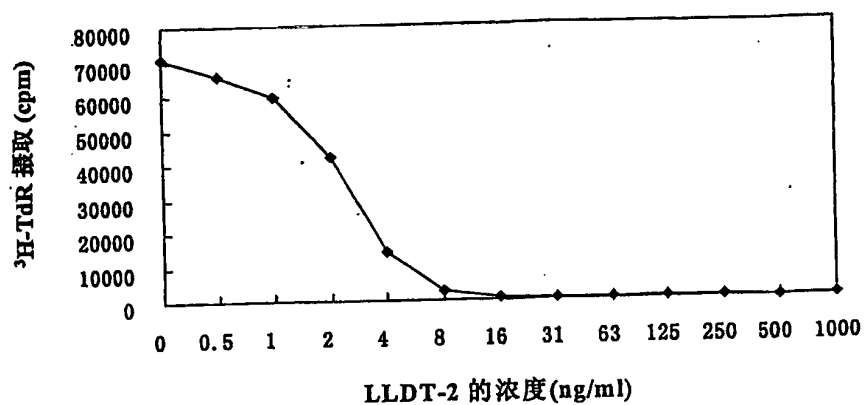


图 7

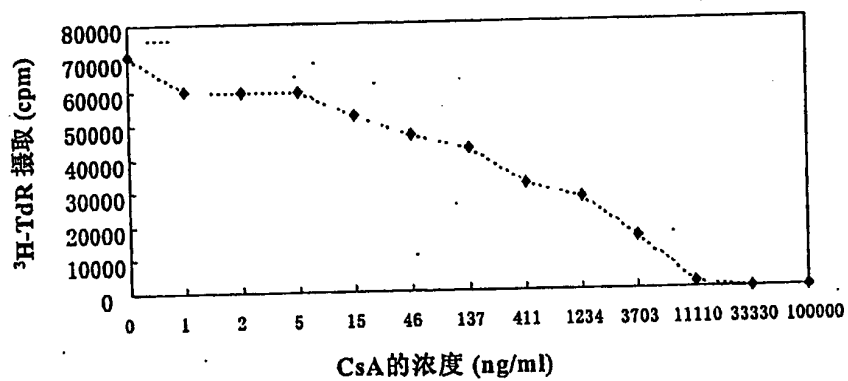


图 8

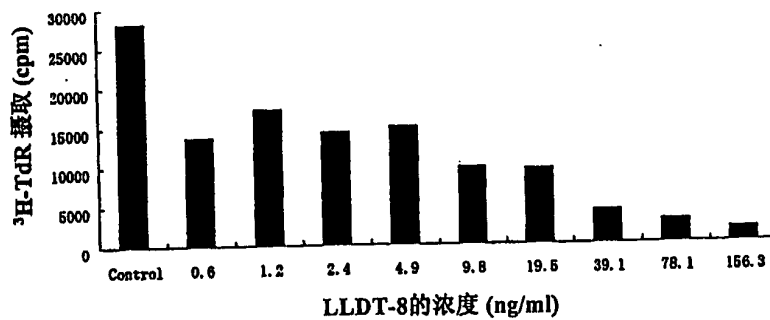


图 9

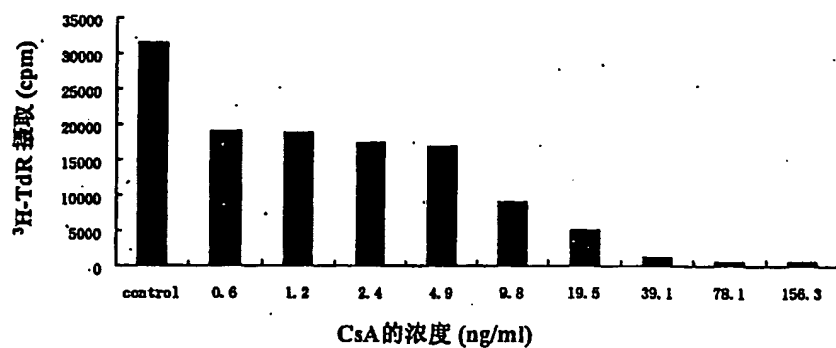


图 10

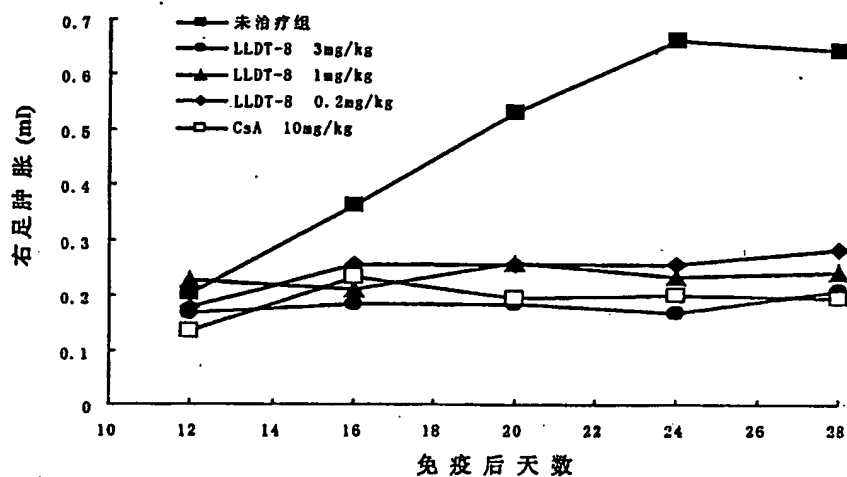


图 11

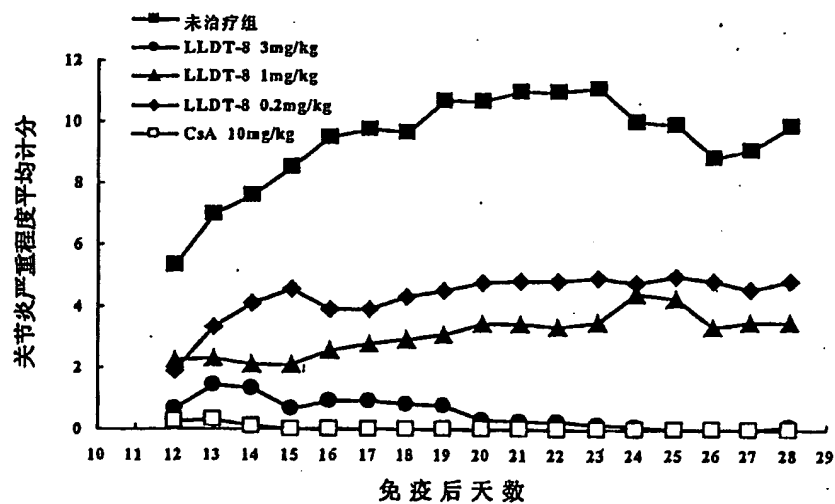


图 13

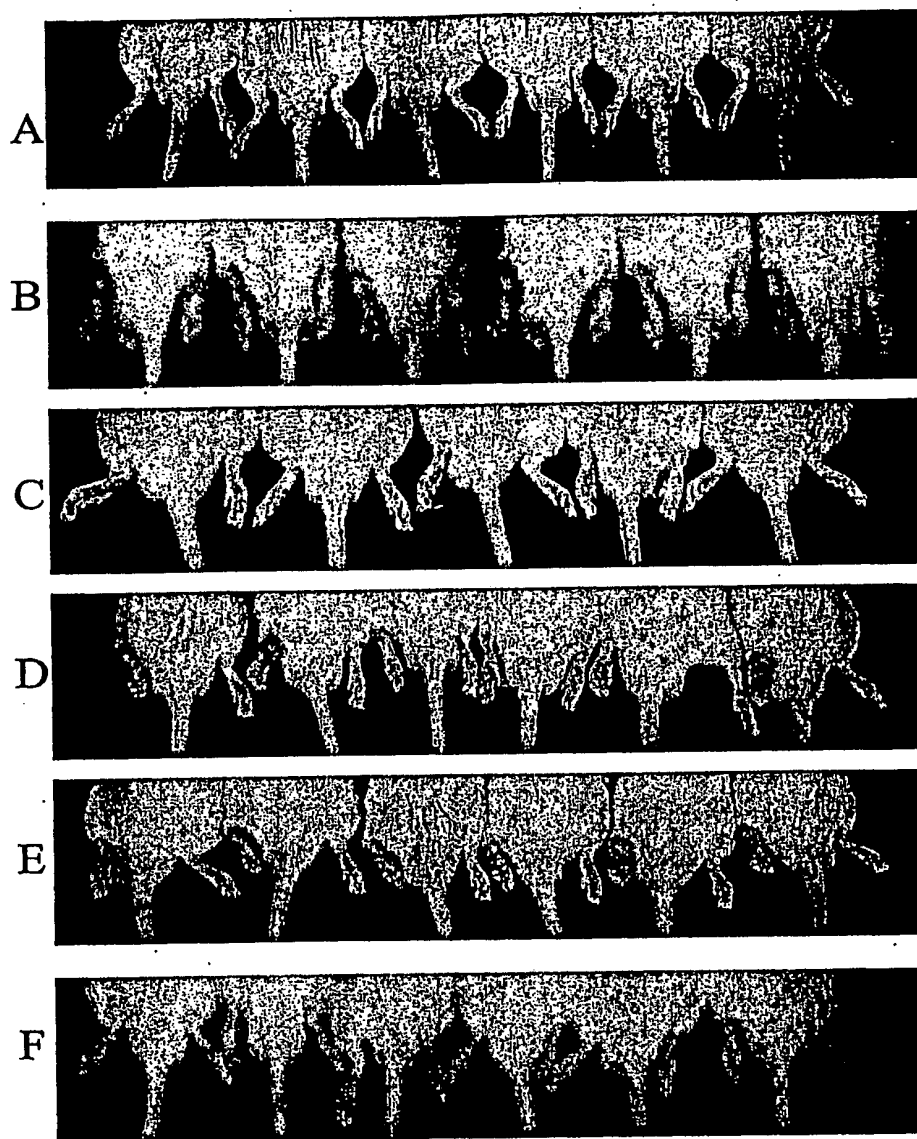


图 12

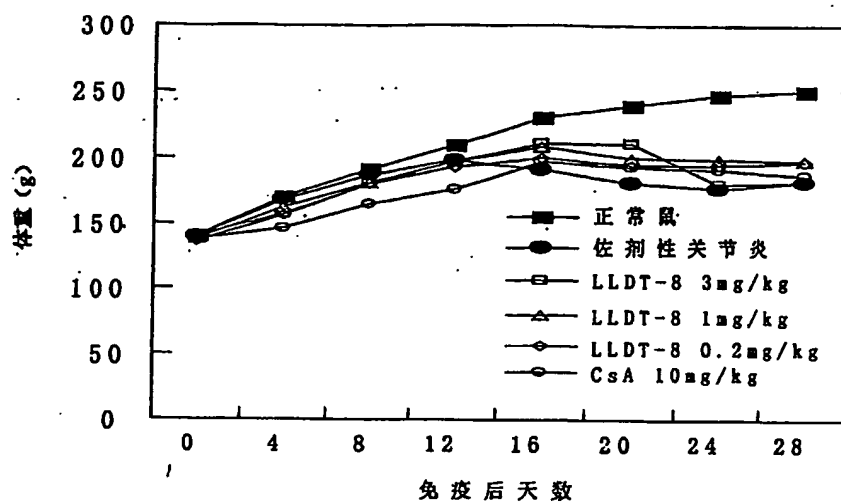


图 14

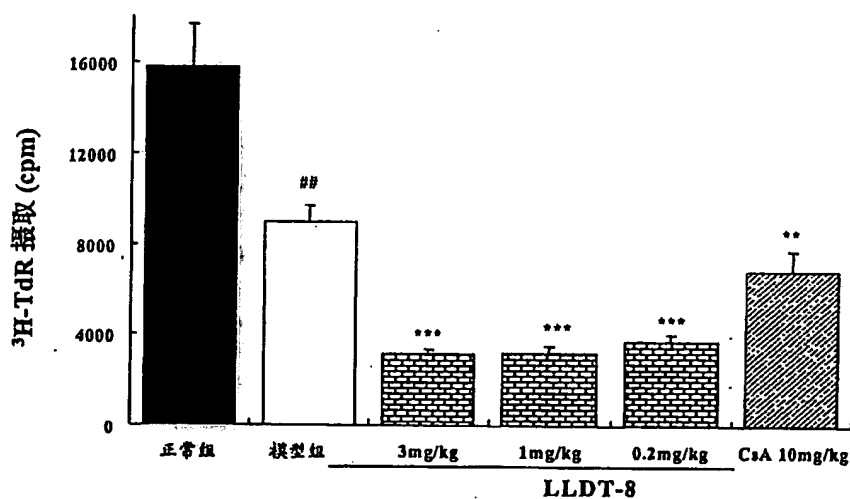


图 15

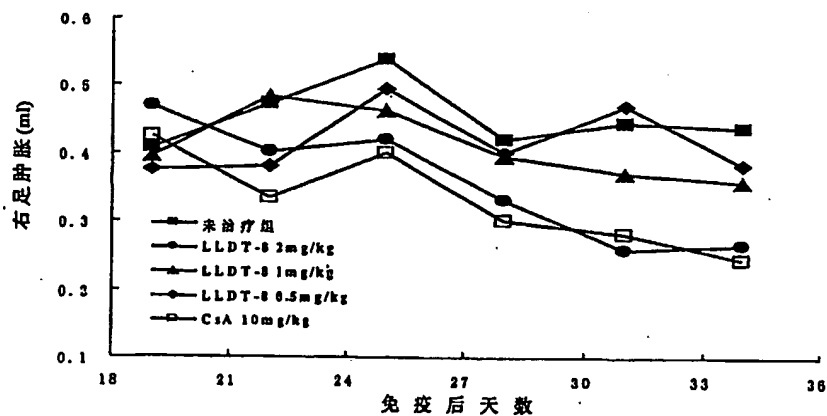


图 16

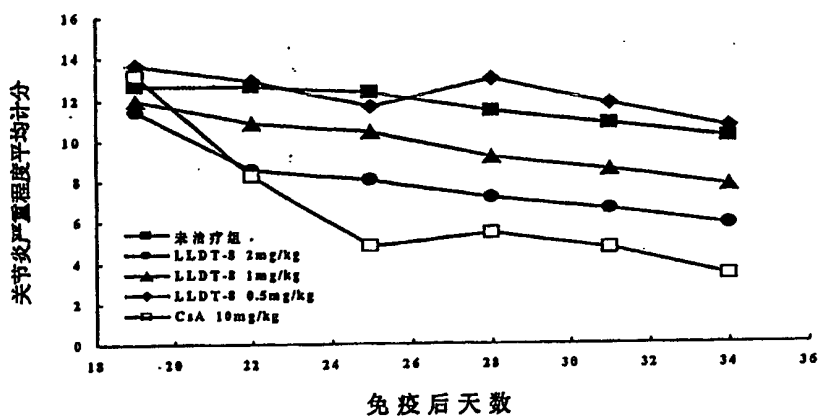


图 17

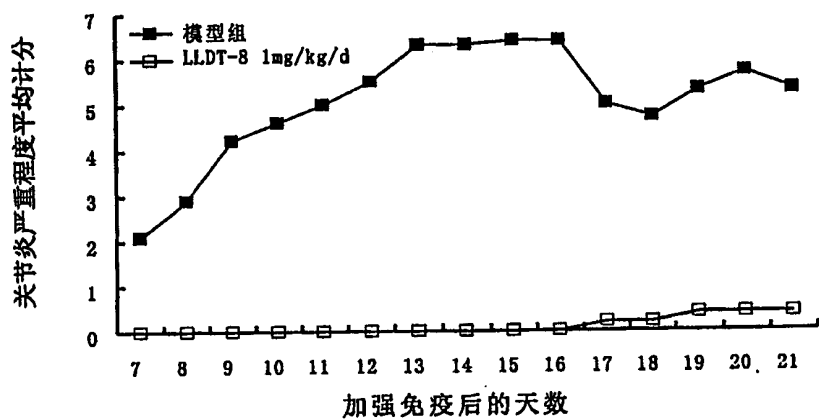


图 18



A. 模型对照组



B. LLDT-8 1mg/kg 治疗组

图 19

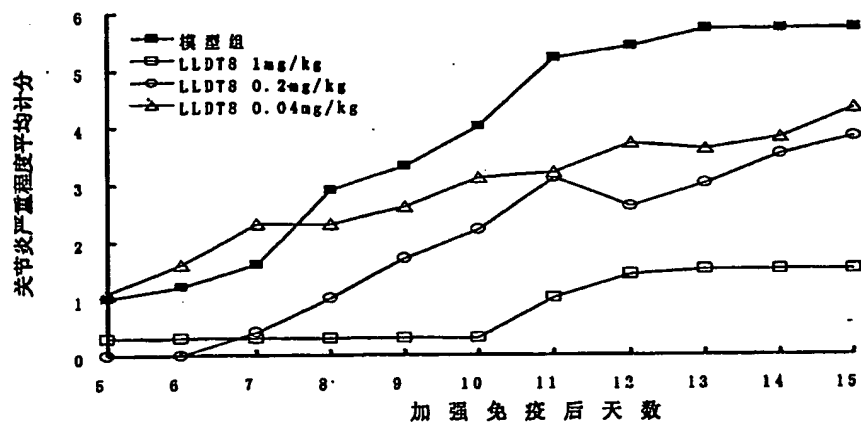


图 20

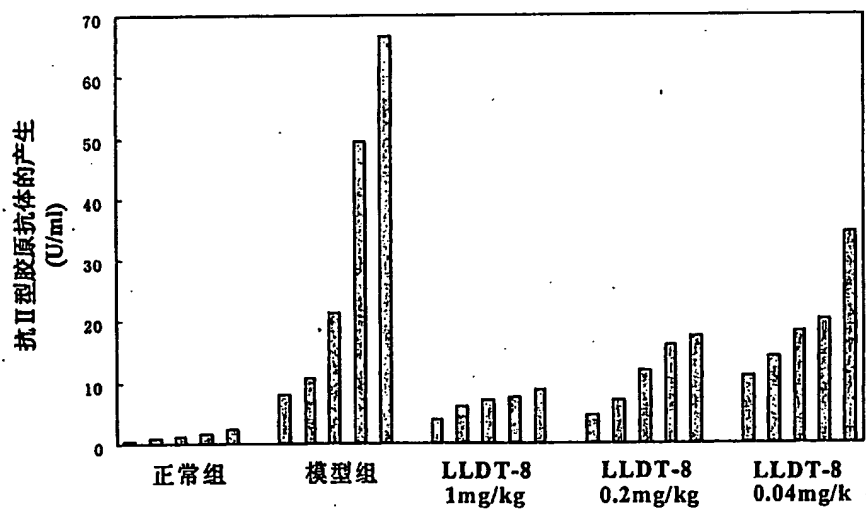


图 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/00095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C07D493/04, C07D493/22, A61K31/34
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6, IPC7, C07D, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI,EPODOC,PAJ,CNPAT, Caplus
Triptolide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1246121A (PHARMAGENESIS INC) , 1.Mar 2002(01/03/2002), Fulltext	1-8
A	CN1261602A (CHENGDU DIAO PHARM CO CHINESE ACAD SCI) 2 Aug 2000 (02/08/2000) Fulltext	1-8
A	CN1257507A (HOECHST MARION ROUSSEL INC.) 21Jun2000 (21/06/2000) Fulltext	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
05.06.03

Date of mailing of the international search report
19 JUN 2003 (19.06.03)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer



Telephone No. 86-10-62093849

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN03/00095

Patent document cited in research report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN1246121A	01-03-2000	US5663335A	02-09-1997
		WO9731920A	04-09-1997
		WO9731921A	04-09-1997
		AU2061397A	16-09-1997
		AU2125897A	16-09-1997
		EP0907651A	14-04-1999
		US5962516A	05-10-1999
		JP2001504437T	03-04-2001
		None	
CN1261602A	02-08-2000		
CN1257507A	21-06-2000	JP2001525851T	11-12-2001
		WO9852951A	26-11-1998
		ZA9804174 A	27-01-1999
		AU7260798 A	11-12-1998
		NO9905723 A	21-01-2000
		EP0983275 A	08-03-2000
		BR9809678 A	11-07-2000
		HU200003398 A	28-03-2001
		MX9910776 A	01-04-2000
		KR2001012822 A	26-02-2001
		NZ500762 A	31-08-2001
		TW434235 A	16-05-2001

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN03/00095

A. 主题的分类

IPC7 C07D493/04, C07D493/22, A61K31/34

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC6, IPC7, C07D, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, CA

Triptolide, 雷公藤内酯醇, 雷公藤内酯

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	CN1246121A (法玛吉尼西斯公司), 1.3 月 2002, 全文	1-8
A	CN1261602A (成都地奥制药集团有限公司), 20.8 月 2002, 全文	1-8
A	CN1257507A (赫斯特.马里昂.罗素公司) 21.6 月 2000, 全文	1-8

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

"A" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

"L" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

"X" 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

05-06-2003

国际检索报告邮寄日期

19. 6. 2003 (19. 0 6. 03)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

授权官员

刘印姝

电话号码: 86-10-62093849

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/00095

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN1246121A	01-03-2000	US5663335A	02-09-1997
		WO9731920A	04-09-1997
		WO9731921A	04-09-1997
		AU2061397A	16-09-1997
		AU2125897A	16-09-1997
		EP0907651A	14-04-1999
		US5962516A	05-10-1999
		JP2001504437T	03-04-2001
CN1261602A	02-08-2000	无	
CN1257507A	21-06-2000	JP2001525851T	11-12-2001
		WO9852951A	26-11-1998
		ZA9804174 A	27-01-1999
		AU7260798 A	11-12-1998
		NO9905723 A	21-01-2000
		EP0983275 A	08-03-2000
		BR9809678 A	11-07-2000
		HU200003398 A	28-03-2001
		MX9910776 A	01-04-2000
		KR2001012822 A	26-02-2001
		NZ500762 A	31-08-2001
		TW434235 A	16-05-2001

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)